

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Ing. Pavel Skála

PŘÍPRAVA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA
DERIVÁTŮ DIHYDROXYBENZOOVÝCH
Kyselín

Disertační práce

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Ing. Pavel Skála

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY
OF DIHYDROXYBENZOIC ACIDS
DERIVATES

Ph.D. Thesis

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové

Ing. Pavel Skála

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval školiteli Doc. PharmDr. Miloši Macháčkovi, CSc., za vedení a pomoc při řešení studované problematiky. Dále bych rád poděkoval Prof. RNDr. Karlu Waisserovi, DrSc., a PharmDr. Lence Kubicové, CSc., za odborné připomínky.

Velký dík patří celé katedře anorganické a organické chemie za umožnění vypracování zadaného úkolu. Jmenovitě bych poděkoval Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., a Prof. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D., za měření NMR spekter, Ivě Vencovské za měření IČ spekter, Kateřině Kolovratníkové a Daně Cardové za měření teploty tání, Petru Jančárkovi za přípravu rozpouštědel, Idě Dufkové a Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D., za hodnocení antifungální aktivity, MUDr. Jarmile Kaustové, CSc., ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě za hodnocení antimykobakteriální aktivity, PharmDr. Karlu Palátovi, CSc., za pomoc při matematickém modelování a Prof. Dr. Reineru Beckertovi za umožnění studijní stáže na Univerzitě v Jeně.

V neposlední řadě bych rád poděkoval celé své rodině za podporu během studia, přátelům a známým za trpělivost, kterou se mnou občas museli mít.

Překládaná disertační práce vznikla za finanční podpory výzkumným záměrem MŠMT ČR (MSM 0021620822 - Výzkum nových lékových struktur).

Abstrakt

Disertační práce je zaměřena na takové deriváty dihydroxybenzoových kyselin, které lze považovat za odvozené od salicylové kyseliny. U připravených látek byla hodnocena jejich antimykobakteriální a antifungální aktivita *in vitro*. V rámci disertační práce bylo připraveno 102 látek, z toho 72 originálních.

Jako výchozí sloučeniny byly připraveny čtyři řady *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů, u nichž tedy jedna hydroxyskupina byla v poloze 2 a poloha druhé se postupně měnila. Jejich thionací za využití patentované metody vyvinuté v naší laboratoři byly získány odpovídající *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidy. Z výchozích *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů byly dále připraveny cyklizační reakcí s methylchlorformiátem čtyři řady 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, s hydroxyl skupinou v poloze 8, 7, 6 a 5. Přímé tavení připravených 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů s Lawessonovým činidlem poskytlo očekávané produkty, 3-fenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-ony a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony, pouze v řadě 5-hydroxyderivátů. Proto byly hledány jiné metody pro přípravu sírných derivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu.

Nejvyšší antifungální aktivity u *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů vykazovaly 2,3- a 2,6-dihydroxyderiváty. Nejvyšší antimykobakteriální aktivita byla zjištěna u 2,4-dihydroxyderivátů. Záměna kyslíku za síru u *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů a podobně cyklizace výchozích látek na odpovídající 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony měly na studované aktivity různý vliv v závislosti na testovaném mikroorganismu a poloze hydroxyskupin(y).

Dále byly připraveny série substituovaných 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů a 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů. Zavedení dvou *terc*-butylových skupin do molekuly se projevilo výrazným růstem antimykobakteriální aktivity, především proti *Mycobacterium kansasii* a klinickému izolátu *M. kansasii*, kdy připravené látky byly účinnější než standard isoniazid. Antifungální aktivita těchto látek byla nevýznamná. V práci je uvedena i příprava derivátů 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionu, které však nevykázaly zajímavou biologickou aktivitu.

Abstract

The dissertation focuses on such derivatives of dihydroxybenzoic acids which can be considered to be derived from salicylic acid. The prepared substances were evaluated for their antimycobacterial and antifungal activity *in vitro*. The work on the dissertation produced 102 compounds, including 72 original ones.

The prepared initial compounds included four series of dihydroxy-*N*-phenylbenzamides, in which one hydroxy group is in position 2 and the position of the second one is successively changed. Their thionation using the patented method developed by our laboratory produced the corresponding dihydroxy-*N*-phenylthiobenzamides. The cyclization reaction of the initial dihydroxy-*N*-phenylbenzamides with methyl-chloroformate yielded four series of 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones with hydroxy groups in positions 8, 7, 6, and 5. Direct melting of prepared 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones with Lawesson's reagent provided the expected products, 3-phenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-ones and 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones, but only in the series of 5-hydroxy derivatives. It was the reason for a search for other methods for the preparation of thionated derivatives of 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione.

The highest antifungal activities were exerted by 2,3- and 2,6-dihydroxy-*N*-phenylbenzamides. The highest antimycobacterial activity was found in 2,4-dihydroxy derivatives. Both the replacement of oxygen by sulphur in dihydroxy-*N*-phenylthiobenzamides and cyclization of the parent compounds to yield the corresponding 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones resulted in differences in biological activities dependent on the microorganism tested and the substitution pattern.

Other series of substituted 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamides and 3,5-di-*tert*-butyl-2,6-dihydroxy-*N*-phenylbenzamides were also prepared. The introduction of two *tert*-butyl groups into the molecule was manifested by a marked increase in antimycobacterial activity, primarily against *Mycobacterium kansasii* and the clinical isolate of *M. kansasii*, where the prepared compounds were more effective than the standard isoniazid. The antifungal activity of these compounds was insignificant. The dissertation also presents the preparation of 3-phenyl-1,2,3-benzotriazine-4(3*H*)-thione derivatives, which did not exert interesting biological activity either.

Použité zkratky:

7/14/21 d	doba inkubace ve dnech
24/48/70/120 h	doba inkubace v hodinách
2D NMR	dvoudimenzonální nukleární magnetická rezonance
AmB	amfotericin B
2D NMR	dvoudimenzonální nukleární magnetická rezonance
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FLU	flukonazol
INH	isoniazid
ir	infračervená spektroskopie
J	interakční konstanta
LD ₅₀	letální dávka působící úhyn 50 % jedinců populace
MDR-TB	multirezistentní kmeny <i>M. tuberculosis</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NMR	nukleární magnetická rezonance
MW	mikrovlnný reaktor
NOE	nukleární Overhauserův efekt
Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibenzylidenaceton)dipalladium
QSAR	kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou
R_f	retenční faktor
RNA	ribonukleová kyselina
SARS	syndrom náhlého selhání dýchání
TBC	tuberkulóza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

Obsah:

1	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY.....	11
1.1	Systémové mykózy.....	11
1.1.1	<i>Léčba systémových mykóz</i>	12
1.2	Tuberkulóza.....	15
1.2.1	<i>Léčba TBC a antituberkulotika</i>	16
1.2.2	<i>Antituberkulotika</i>	17
1.3	Biologická aktivita salicylanilidů a jejich analogů.....	22
1.3.1	<i>Biologická aktivita salicylanilidů</i>	22
1.3.2	<i>Biologická aktivita thiosalicylanilidů</i>	24
2	CÍL PRÁCE.....	26
3	METODICKÁ ČÁST.....	27
3.1	Příprava 2-hydroxybenzanilidů.....	27
3.2	Příprava 2-hydroxythiobenzanilidů.....	29
3.3	Příprava 2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů.....	32
3.4	Příprava 2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionů a jejich monosirných analogů.....	34
3.5	Příprava <i>terc</i> -butylderivátů salicylové kyseliny.....	36
3.5.1	<i>Příprava mono-terc-butylderivátů salicylové kyseliny</i>	36
3.5.2	<i>Příprava di-terc-butylderivátů salicylové kyseliny</i>	37
3.6	Příprava 1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-thionů.....	38
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Příprava <i>N</i> -fenyl-dihydroxybezamidů.....	39
4.2	Příprava <i>N</i> -fenyl-dihydroxythiobezamidů.....	49
4.3	Příprava hydroxyderivátů 3-fenyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionu.....	58
4.4	Příprava hydroxyderivátů 3-fenyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionu a jejich monosirných analogů.....	64
4.4.1	<i>Příprava tavením s Lawessonovým činidlem</i>	64
4.4.2	<i>Příprava monosirných analogů cyklizačními reakcemi</i>	68
4.4.2.1	<i>3-(4-Chlorfenyl)-7-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2<i>H</i>-1,3-benzoxazin-2-on</i>	68
4.4.2.2	<i>Příprava 3-(4-chlorfenyl)-7-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4<i>H</i>-1,3-benzoxazin-4-onu</i>	68
4.4.2.3	<i>Pokus o přípravu 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4<i>H</i>-1,3-benzoxazin-4-onu</i>	72
4.4.2.4	<i>Příprava 3-(4-chlorfenyl)-2-thioxo-2,3-dihydro-4<i>H</i>-1,3-benzoxazin-4-onu</i>	72
4.4.2.5	<i>Reakce 2,3-dihydroxy-<i>N</i>-(4-methylfenyl)benzamidů s thiofosgenem</i>	73

4.5	Příprava hydroxyderivátů 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenylbenzamidů	74
4.5.1	Příprava 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenyl-2-hydroxybenzamidů	74
4.5.1.1	Příprava 3,5-di- <i>terc</i> -butyl-2-hydroxybenzoové kyseliny	74
4.5.1.2	Příprava 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenyl-2-hydroxybenzamidů	75
4.5.2	Příprava 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenyl-2,6-dihydroxy-benzamidů	78
4.5.2.1	Příprava 3,5-di- <i>terc</i> -butyl-2,6-dihydroxybenzoové kyseliny	78
4.5.2.2	Příprava 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenyl-2,6-dihydroxy-benzamidů	80
4.6	Příprava derivátů 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-thionu	82
4.7	Metody používané v experimentální části	87
5	VÝSLEDKY HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY	88
5.1	Antimykobakteriální aktivita	88
5.1.1	Antimykobakteriální hodnocení <i>N</i> -fenyl-dihydroxybenzamidů	88
5.1.2	Antimykobakteriální hodnocení <i>N</i> -fenyl-dihydroxythiobenzamidů	90
5.1.3	Antimykobakteriální hodnocení 3-fenyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	92
5.1.4	Antimykobakteriální hodnocení hydroxyderivátů 3-fenyl-4-thioxo- 3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2-onu	93
5.1.5	Antimykobakteriální hodnocení 3-fenyl-5-hydroxy-2 <i>H</i> -1,3- benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionů	93
5.1.6	Antimykobakteriální hodnocení vybraných látek připravovaných cyklizačními reakcemi	94
5.1.7	Antimykobakteriální hodnocení 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenyl-2- hydroxybenzamidů	95
5.1.8	Antimykobakteriální hodnocení 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenyl- 2,6-dihydroxybenzamidů	95
5.1.9	Antimykobakteriální hodnocení 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-thionů	96
5.2	Antifungální aktivita	97
5.2.1	Antifungální hodnocení <i>N</i> -fenyl-dihydroxybenzamidů	97
5.2.2	Antifungální hodnocení <i>N</i> -fenyl-dihydroxythiobenzamidů	100
5.2.3	Antifungální hodnocení 3-fenyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	102
5.2.4	Antifungální hodnocení 3-fenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,3- benzoxazin-2-onů	103
5.2.5	Antifungální hodnocení 3-fenyl-5-hydroxy-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin- 2,4(3 <i>H</i>)-dithionů	104
5.2.6	Antifungální hodnocení vybraných látek připravovaných cyklizačními reakcemi	105
5.2.7	Antifungální hodnocení 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenyl-2-hydroxybenzamidů	106
5.2.8	Antifungální hodnocení 3,5-di- <i>terc</i> -butyl- <i>N</i> -fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů	107

5.2.9	<i>Antifungální hodnocení 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thionů</i>	108
6	DISKUSE.....	109
6.1	Chemická část.....	109
6.2	Mikrobiologická část.....	117
6.2.1	<i>Antimykobakteriální hodnocení</i>	117
6.2.2	<i>Antifungální hodnocení</i>	119
7	ZÁVĚR.....	121
8	SEZNAM LITERATURY.....	122
9	PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA.....	145
9.1	Práce související s disertační prací.....	145
9.2	Práce nesouvisející s disertační prací.....	145
9.3	Příspěvky na symposiích.....	145
10	PŘÍLOHA.....	148

1 Přehled současného stavu problematiky

Infekční nemoci zůstávají závažným problémem i přes neustálý rozvoj medicíny, který přináší jak nové léčebné prostředky, tak i postupy. Za infekční choroby označujeme onemocnění, jejímiž původci jsou různé druhy mikroorganismů, převážně bakterie, viry, houby, plísně, prvoci, či jiní paraziti. Zatímco výskyt některých infekčních onemocnění se podařilo snížit, případně zcela vymýtit, jiná jsou stále aktuální nebo postupem doby nabývají na významu. K posledně jmenovaným patří nemoci vyvolané houbami, zejména systémové mykózy, a nemoci, vyvolané bakteriemi rodu *Mycobacterium*, jako je tuberkulóza a další onemocnění.

1.1 Systémové mykózy

Nemoci způsobené mikroskopickými houbami – mezi něž patří především kvasinky a plísně, označujeme jako mykózy. Existuje více než 100 tisíc různých druhů hub, z nichž přibližně 300 druhů je patogenních pro člověka.^{1, 2} Tyto patogeny mohou napadat živou tkáň, produkovat mykotoxiny nebo mohou nepřímo působit, tím že mohou např. vyvolávat alergie. Podle místa zasažení rozlišujeme mykózy povrchové, postihující kůži a sliznice, a systémové mykózy. Systémové mykózy³ rozeznáváme invazivní, kdy je napaden jeden orgán, nebo diseminované, kdy je napadeno více orgánů, či celý organismus. Od 80. let minulého století začal výskyt mykotických onemocnění narůstat z důvodu zvyšování počtu imunosuprimovaných osob. Zvyšování incidence bylo způsobeno jak používáním širokospektrých antibiotik, cytostatik, tak i postupy při transplantacích, šířením viru HIV i používáním implantátů z umělých hmot. Systémové mykózy označujeme podle jejich vyvolavatele jako kandidózy, aspergilózy, mukormykózy a kryptokokózy. Kandidózy jsou způsobené kvasinkami a jsou nejčastějšími systémovými mykózami, převážně se s nimi setkáváme v transplantačních a hematologických zařízeních nebo na jednotkách intenzivní péče. Nejčastěji jsou vyvolané kvasinkou *Candida albicans*. V evropských zemích se uvádí incidence 2 – 5 případů hematogenní kandidové infekce na 100 000 obyvatel, přičemž počty v USA jsou dvojnásobné.^{4, 5} Druhou významnou systémovou mykózou je aspergilóza, vyvolaná plísní rodu *Aspergillus*, která se vyskytuje hlavně u pacientů s hematologickým onemocněním, po transplantaci jater nebo ledvin. V roce 2005 bylo zveřejněno, že výskyt aspergilózy po transplantaci kostní dřeně je 5 – 28 %, po

transplantaci jater 7 – 42 % a ledvin 0 – 14 %.⁶ Mukormykóza (zygomykóza, fykomykóza) je onemocnění, které je způsobeno parazitickými houbami rodů *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor*. Jedná se o životohrožující invazivní houbové infekce, které mohou mít často fatální následky. Houby prorůstají cévami v plicích a v nervové tkáni a může dojít ke vzniku krevních sraženin. Houby, které tuto nemoc způsobují, můžeme nalézt jak v tlejících rostlinách, půdě tak i klimatizaci. Nejčastěji jsou postiženy hematologičtí pacienti a lidé po transplantaci orgánů. Pacienty s defektem T lymfocytů může postihnout i kryptokokóza (původce houby rodu *Cryptococcus*), která nejčastěji postihuje plíce, ale může se rozšířit i na jiné orgány.

1.1.1 Léčba systémových mykóz⁷

K léčbě systémových mykóz používáme systémová antimykotika⁷, která mohou mít buď působení fungicidní – usmrcují houbové buňky, nebo fungistatické – inhibují jejich růst. Podle chemického složení rozlišujeme následující skupiny antimykotik³ - polyeny, antimetabolity, azoly, echinokandiny. Z hlediska mechanismu účinku se v klinické praxi uplatňují převážně látky působící na syntézu ergosterolu, který je nezbytnou komponentou plazmatické membrány hub. Dalším ideálním místem zásahu je buněčná stěna, neboť některé enzymy, které se podílejí na její biosyntéze, jsou specifické pouze pro houby. Proto se při vývoji nových látek můžeme zaměřovat na enzymy nezbytné pro syntézu chitinu či glukanu. Látky mohou působit také na úrovni jádra nebo jiným specifickým mechanismem.

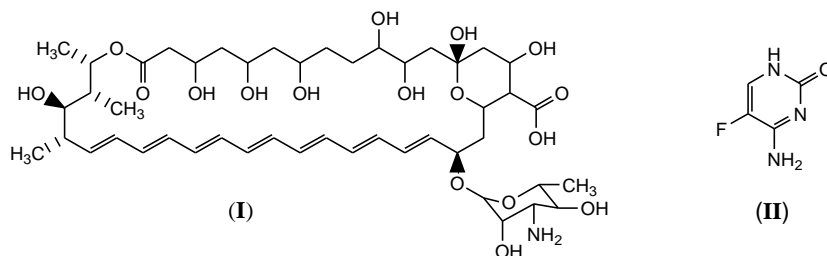
Přehled současných systémových antimykotik, rozdělených podle chemického složení:

1) Polyeny (amfotericin B, nystatin, natamycin)

Amfotericin B (**I**, AmB) se jako jediné z polyenových antibiotik používá v klinické praxi. Působí fungicidně a vytváří komplex (pór) s ergosterolem, a tím narušuje bariérovou funkci plazmatické membrány. Samotný AmB je nerozpustný ve vodě, perorálně se nevstřebává a parenterálně je toxický. Konvenční AmB (Fungizone) je solubilizován v koloidní suspenzi s natrium-deoxycholátem (denní dávka 0.3-1 mg/kg).

AmB může být vázaný na lipozómy (AmBisome) (denní dávka 3-5 mg/kg), ve formě koloidní disperse (Amphotec) s cholesterol-sulfátem (denní dávka 3-8 mg/kg) nebo lipidového komplexu (Abelcet, denní dávka 5 mg/kg). U lipozomálního AmB byla

prokázána nižší toxicita⁸, se stejným účinkem jako v případě konvenčního AmB při léčbě invazivní aspergilózy. AmB je širokospektrý s nízkým výskytem rezistencí, působí proti zygomycetám a také protozoím.



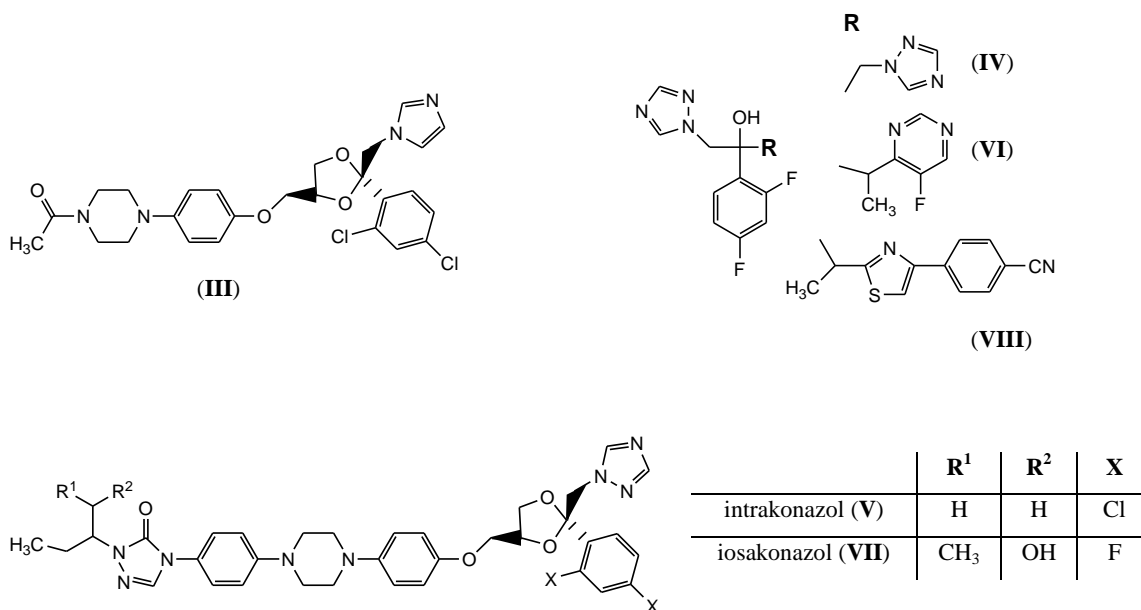
2) Antimetabolity (flucitoxin)

Zástupcem antimetabolitů je flucitoxin, chemicky se jedná o 5-fluorcytosin (II) a působí proti rodům *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium* a *Cryptococcus*. Flucitoxin (Ancotil) působí fungistaticky tím, že se falešně vestaví do mRNA a tRNA a poté je přeměněn deaminací na toxický 5-fluoruracil. Jeho nevýhodou je, že u něho rychle nastupuje rezistence, proto se často kombinuje s AmB.

3) Azoly imidazoly – ketokonazol (III); triazoly – flukonazol (IV), itrakonazol (V), vorikonazol (VI), posakonazol (VII), ravukonazol (VIII)

Azoly se někdy rozdělují na azoly první generace – flukonazol (Diflucan, Mycomax), itrakonazol (Sporanox, Prokanazol) a druhé – vorikonazol (Vfend), posakonazol (Noxafil), ravukonazol. U této skupiny látek je nutné, aby heterocykl obsahoval atom dusíku v poloze 3 (imidazoly) a 4 (triazoly), který se potom váže na atom železa v enzymu. Azoly inhibují syntézu ergosterolu ve fázi demethylace (inhibice enzymu cytochrom P-450), tj. přeměnu lanosterolu na ergosterol. Azoly působí fungistaticky a nevýhodou je vznik rezistence a ovlivňování savčího cytochromu P-450 (pokles hladiny testosteronu a glukokortikoidů). Novější azoly jsou k savčímu cytochromu P-450 mnohem šetrnější. Ketokonazol při dlouhodobém podávání může vyvolat antiandrogenní efekt – oligospermii a impotenci a při vyšších dávkách poškozuje játra. Flukonazol působí na kandidy a kryptokoky, ale je rezistentní na aspergily a *C. krusei*, v porovnání s AmB ukázal srovnatelnou účinnost u kandidémie u non-neutropenických pacientů i nižší toxicitu⁹. Azoly druhé generace vykazují účinnost

proti *C. krusei*, proti které je flukonazol neúčinný. Vorikonazol patří k významným lékům první volby proti aspergilózám, v randomizované studii¹⁰ invazivní aspergilózy po 12 týdnech přežilo 71 % po podání vorikonazolu a po AmB 59 %, i s méně vedlejšími účinky.



4) Echinokandiny – kaspofungin (Candidas) , mikafungin (Micamine), anidulafungin (Ecalta)

Chemicky se jedná o lipopeptidy, které působí zcela odlišným mechanismem. Inhibují syntézu 1,3-beta-D-glukanu, který je významnou součástí houbové stěny¹¹, což vede k poruchám funkce. Z tohoto důvodu se echinokandiny hodí do kombinace s ostatními systémovými antimykotiky. Zástupci echinokandinů se od sebe, co do účinnosti¹² a bezpečnosti, výrazně neliší, k dispozici jsou pouze v parenterální formě. Echinokandiny mají široké spektrum účinku a působí na kandidy včetně rezistentních na triazoly, aspergily a cystickou formu *Pneumocystis jiroveci*. Kaspofungin a mikafungin vykazují u *Candida albicans* po jednod hodinové expozici *in vitro* významně delší (5–6 hodin) postantifungální efekt (PAFE - doba nutná k reparaci poškozené buněčné stěny po expozici antimykotiku) ve srovnání s triazoly (0,5 hod). V případě *Aspergillus fumigatus* vykazoval dlouhý PAFE (7–8 hodin) pouze AmB, zatímco triazoly a echinokandiny jen velmi krátký (0,5 hodiny)¹³. Mikafungin je dosud jediným zástupcem z echinokandinů, který je schválen pro užití u dětí včetně nedonošenců¹⁴. Mezi další látku z této skupiny patří HMR 3270 (Indevus), který je ale ve fázi klinického výzkumu.

Látky ze skupiny systémových antimykotik byly v posledních letech obohaceny o nové azoly a echinokandiny. V současné době se studují nové skupiny látek z oblasti systémových antimykotik, např. pradimicinů (benanomycinu A), nikkomycinů (nikkomycin Z) nebo derivátů sordarinu, z důvodu rezistence a toxicity současných látek¹⁵. I když vývoj nových systémových antimykotik pomalým krokem pokračuje, je ale třeba paletu nových přípravků neustále rozšiřovat. Transplantace, virus HIV, rakovina, stres a další okolnosti oslabují lidský organismus, který je poté snadným terčem pro houbové infekce. Navíc některé kmeny se stávají rezistentní na jednotlivé přípravky a některé přípravky jsou pro řadu lidí nedostupné.

1.2 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je pokládána za jedno z nejstarších onemocnění. Příčina choroby zůstávala dlouho neprokázána, až v roce 1882 objevil německý mikrobiolog R. Koch, že chorobu způsobuje bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Dalším výzkumem se zjistilo, že kromě *M. tuberculosis* může být vyvolána dalšími obligátně patogenními mykobakteriemi. Dalšími patogenními kmeny pro člověka jsou *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*, kromě kterých existují ještě potenciálně patogenní, které vyvolávají klinicky obdobná onemocnění nazývaná mykobakteriózy. Mezi potenciálně patogenní mykobakterie patří např. *M. kansasii*, *M. avium*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*. Nejčastěji se setkáváme s TBC plic, která se vyskytuje zhruba z 80 % a přenáší se nejčastěji kapénkovou infekcí, nebo kontaktem s infikovanou tkání. Do těla vstupují mykobakterie nejčastěji dýchacími cestami s následným vznikem tzv. plicní složky primárního komplexu a následuje kaskáda imunitních reakcí. Celý průběh TBC má tři fáze, a to *prealergickou fázi*, *primární tuberkulózu* a *postprimární tuberkulózu*. V některých případech nemusí být primárně infikovány plíce, ale lymfatické uzliny, zejména v krku, střevní trakt, kosti, ledviny, mozkomíšní pleny apod. Pokud nedojde ke zhojení plicní či uzlinové složky primárního komplexu, mohou mykobakterie pronikat krví do celého těla. Kromě TBC plic se tedy můžeme setkat s **TBC periferních uzlin**, která postihuje hlavně krční uzliny, která je po TBC plic nejčastější. Kromě **tuberkulózy kůže a podkoží** se setkáváme i s **tuberkulózním zánětem páteře** nebo kolenního a kyčelního kloubu. U **tuberkulózy urogenitální**, jejímž původcem je *M. tuberculosis*, se jedná pouze o sekundární postižení, které narůstá s pandemií HIV. **Tuberkulóza střev** je vzácné onemocnění a

objevuje se při primární rozsáhlé plicní tuberkulóze. I když se zdá, že tato nemoc je nyní z pohledu západního světa minoritní, jsou touto nemocí infikovány asi 2 miliardy lidí. Tato nemoc je často spojena s chudobou, bídou a špatným imunitním systémem, a proto se s ní často setkáváme v rozvojových zemích. Z důvodu poruchy imunitního systému je TBC spojena s úmrtím lidí nakažených HIV. Podle Světové zdravotnické organizace onemocní ročně asi 8 milionů lidí, z toho 3 milióny zemřou. Podle dat z Registru TBC se v roce 2008 vyskytlo v ČR 879 případů onemocnění tuberkulózou, 607 u mužů a 366 u žen, což představovalo 9,5 případu na 100 tis. obyvatel. Nejčastější formou onemocnění byla TBC dýchacího ústrojí. Z hlediska věku postižených je nejvyšší nemocnost TBC u mužů i žen v kategorii osob nad 75 let. Do Registru TBC bylo v **roce 2008 hlášeno 57 úmrtí (52 v roce 2006)**, příčinou byla vždy TBC dýchacího ústrojí¹⁶. WHO, která monitoruje výskyt TBC, kdy v roce 1993 bylo 7 mil. nových případů a 1,6 mil. zemřelo. V roce 2007 na 9,3 mil. nových případů 1.8 mil. zemřelo. WHO si dala cíl, kterým chce do roku 2015 snížit o 50 % z roku 1990 (150 případů na 100 tis a 15 zemřelo). Do roku 2050 chce na 1 mil. obyvatel max. 1 výskyt¹⁷.

1.2.1 Léčba TBC

Tuberkulóza se v dnešní době léčí především kombinací dostupných antituberkulotik^{7, 18}. Pro prevenci je k dispozici očkování, jedná se o oslabený kmen *M. bovis* (BCG = virulentní Bacil Calmette Guerin), ale toto očkování nemá 100% účinnost.

Používaná antituberkulotika rozdělujeme do dvou řad. Do první řady patří: isoniazid (INH), rifampicin (RMP), pyrazinamid (PZA), ethambutol (EMB) a streptomycin (STM). V této první řadě jsou látky, které mají vysokou účinnost a jsou méně toxické. Do druhé řady patří látky, které se aplikují až tehdy, pokud látky z první řady jsou neúčinné. Látky z druhé skupiny jsou většinou toxičtější a dražší, ale nemusí to vždy platit. Do druhé třídy patří: kyselina *p*-aminosalicylová (PAS), ethionamid, prothionamid, viomycin, kapreomycin, cykloserin a jeho derivát terizidon, ze sulfonů dapson, moderní fluorochinolony – perfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin, a také případně makrolidy jako azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, skupina aminoglykosidů - např. amikacin a kanamycin, rifamyciny – rifabutin, rifapentin. Dnes se k léčení tuberkulózy používají kombinace dvou až čtyř antituberkulotik. Především se jedná o isoniazid, pyrazinamid, rifampicin, ethambutol

jako léčiva podávaná perorálně a streptomycin podávaný parenterálně. Důvodem pro využívání kombinací těchto pěti léčiv je snaha o předcházení vzniku rezistence na tyto léky u mykobakterií, dosažení nižší toxicity a menších vedlejších účinků. U některých antituberkulotik je znám mechanismus účinku.

1.2.2 Antituberkulotika (AT)

Kromě klasického rozdělení do dvou linií¹⁸, WHO rozděluje antituberkulotika do 5 skupin¹⁹.

a) Skupina č. 1 (perorální antituberkulostatika první linie): isoniazid (INH), ethambutol (EMB), pyrazinamid (PZA), rifampicin (RIF) a rifabutin (RIFAB)

Isoniazid (IX)

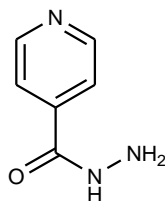
Mechanismus účinku INH spočívá v interferenci při syntéze kyseliny mykolové, která je nezbytná pro tvorbu buněčné stěny mykobakterií. Působí výrazně proti patogenním kmenům pro člověka a na mnohé atypické kmeny je méně citlivý. V současné době patří k nejúčinnějším antituberkulotikům.

Ethambutol (X)

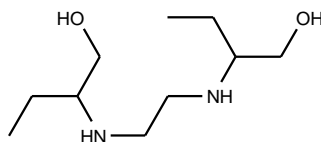
Opticky aktivní sloučeninou typu aminoalkoholu se dvěma chirálními centry. Účinný je pouze pravotočivý *S,S*-(+)-izomer, přičemž *R,R*-stereoizomer může způsobit slepotu. Mechanismus účinku spočívá v polymerizaci arabinosy ve stěně mykobakteria. Místem účinku je arabinofuranosyltransferasa, jež katalyzuje biosyntézu lipoarabinomannanu nezbytného pro zachování integrity mykobakteriální stěny. Používá se při léčbě plicní tuberkulózy vyvolané komplexem *M. avium* u pacientů se syndromem získané imunodeficience.

Pyrazinamid (XI)

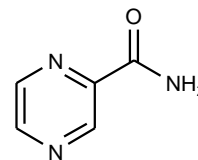
Strukturní analog nikotinamidu, který inhibuje nikotinamidásu. Jedná se o proléčivo, ze kterého vzniká uvnitř mykobakteria aktivní metabolit pyrazin-2-karboxylová kyselina. Je aktivní proti *M. tuberculosis*, *M. xenopi* a *M. avium*. Je vhodný především k iniciální fázi terapie nebo při postižení CNS, a to v kombinaci s isoniazidem a rifampicinem.



(IX)



(X)



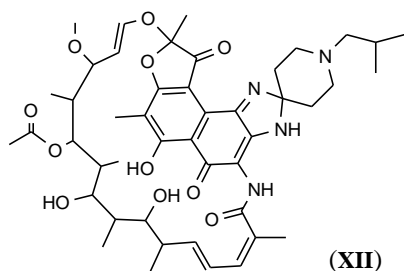
(XI)

Rifampicin (XII)

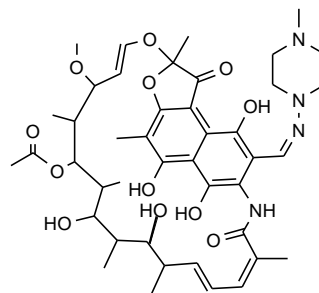
Patří do skupiny ansamycinových antibiotik a inhibuje syntézu DNA navázáním na β -jednotku DNA-dependentní RNA-polymerázy. Působí jak na některé viry, tak i gram-pozitivní a gram-negativní koky. Je možno ho použít i v případě mykobakterií způsobené potenciálně patogenními bakteriemi.

Rifabutin (XIII)

Jedná se o semisyntetické antibiotikum, které je strukturně podobné rifampicinu s podobným mechanismem účinku. Je účinný jak proti gram-pozitivním, tak i některým gram-negativním bakteriím. Současně je aktivní i proti vysoce rezistentním mykobakteriím, např. *M. tuberculosis*, *M. leprae* a *M. avium-intracellulare*.



(XII)

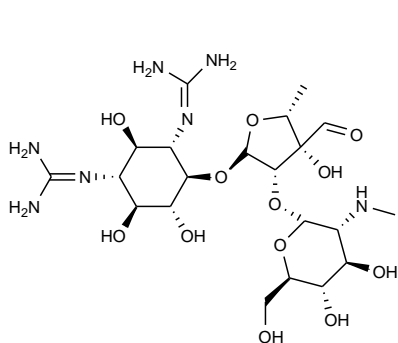


(XIII)

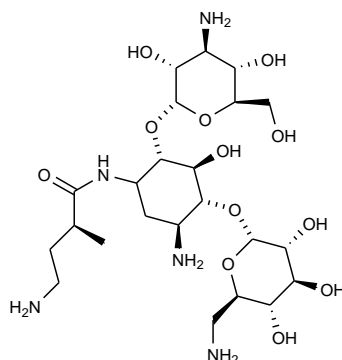
b) Skupina č. 2 (injekční léčiva): streptomycin (XIV, STR), amikacin (XV, AMI), kanamycin (XVI, KAN), kapreomycin (XVII, CAP).

Streptomycin (XIV), amikacin (XIV) a kanamycin (XIV) patří mezi aminoglykosidová antibiotika. Látky se v léčbě tuberkulózy příliš nepoužívají, neboť jsou toxické (streptomycin - aldehydická funkce) nebo se musí podávat ve větších dávkách, jelikož jsou méně účinná. U kanamycinu rozeznáváme tři deriváty (označené A, B, C), které se rozlišují uspořádáním skupiny NH_2 a OH . Kapreomycin (XVII) je

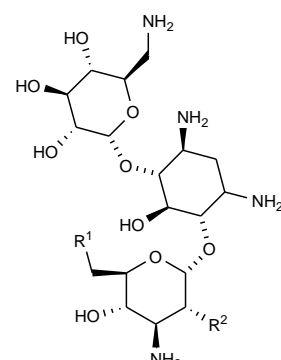
polypeptidové antibiotikum, které je produkováno kmeny streptomycet. Tyto látky se váží na podjednotku ribozómu 30S, a tím je znemožněna syntéza proteinů.



(XIV)



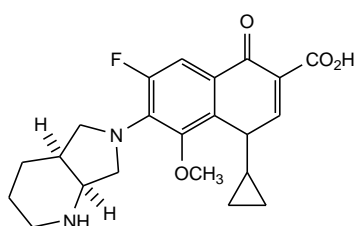
(XV)



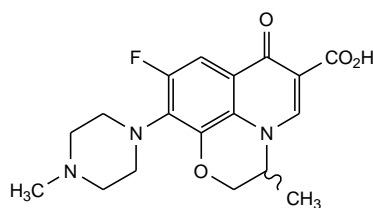
(XVI)

c) Skupina č. 3 – fluorochinolony: moxifloxacin (XVIII, MOXI), levofloxacin (XIX, LEV), oxifloxacin (XX, OFL)

Důležitá skupina látek obsahující fluor v molekule. Tato skupina antibakteriálních látek má široké spektrum účinku proti gram-pozitivním a gram-negativním, mykobakteriálním, tak i anaerobním organismům²⁰. Tyto látky inhibují topoizomerázu II (DNA gyráza), tento enzym je nutný k oddělení replikovaných DNA a tím inhibuje dělení buněk. Předpokládá se, že DNA gyráza je jediným místem účinku fluorochinolonů²¹. Moxifloxacin je aktivnější proti *M. kansasii* než vůči komplexu *M. avium*. Vedlejší účinky fluorochinolonů jsou vzácné, někdy se vyskytuje poškození nervů nebo srdečního svalu. Levofloxacin (XIX) je levotočivou (*S*) formou racemického (*R/S*) ofloxacinu (XX). Další účinná látka ze skupiny fluorochinolonu je ciprofloxacin, ale ten podle třídění WHO není v této skupině antituberkulotik zahrnut.



(XVIII)



(XX)

d) Skupina č. 4 (perorální a bakteriostatické látky druhé linie): ethionamid (ETA), prothionamid (PRO), cykloserin (CYS), terizodon (TRD), p-aminosalicylová kyselina (PAS)

Ethionamid (XXI) a prothionamid (XXII)

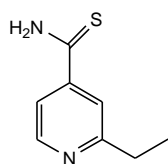
Chemicky se jedná o thioamidy isonikotinové kyseliny. Tyto látky se používají pouze výjimečně v kombinaci s jinými antituberkulotiky u plicní a mimoplicní tuberkulózy, neboť jsou velmi toxické a nastává rychlý nástup rezistence. Ethionamid se také někdy používá v případě rezistence na antituberkulotika první řady. Látky patří k inhibitorům amidázy InhA, podobně jako isoniazid.

Cykloserin (XXIII) a terizodon

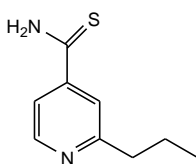
Inhibují syntézu peptidoglykanu, podstatné složky buněčné stěny. Cykloserin blokuje D-alanin racemázu a D-alanyl-D-alanin ligázu²¹.

Kyselina p-aminosalicylová (XXIV)

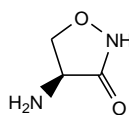
Antimetabolit, který blokuje syntézu DNA. Chelatuje též Fe a porušuje syntézu mykobaktinu. Ve vyspělých zemích se tato látka už nepoužívá, velkou nevýhodou je riziko vzniku rezistence a vysoké terapeutické dávky (12-16 g denně)⁷.



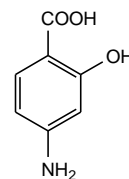
(XXI)



(XXII)



(XXIII)



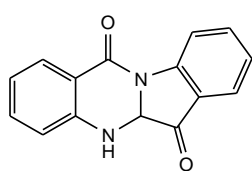
(XXIV)

e) Skupina č. 5 – klarithromycin (CLA), linezolid (LIN), amoxicilin/klavulanát (AMX), klofazimin (CLOF), thiacetazon (THA) a imipenem (IMP)

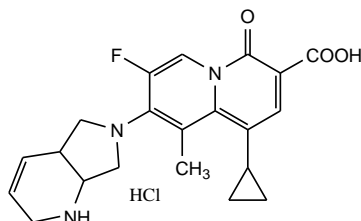
Jedná se o antituberkulotika, které mají nejasný účinek nebo nejasnou roli při léčbě MDR-TB. Tyto látky WHO nedoporučuje k rutinnímu užívání v případě pacientů s MDR-TB.

Výzkum a vývoj nových antituberkulotik neustále pokračuje. Stávající látky ať už z pohledu ceny, toxicity, rezistence nebo vedlejších účinků nestačí k vyřešení tak

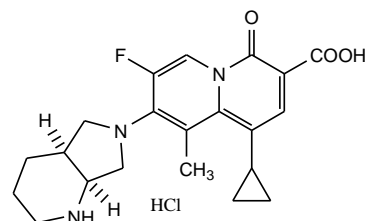
závažného onemocnění, jako je tuberkulóza. Hlavním cílem současného výzkumu je nalézt levná a efektivní léčiva proti MDR-TB a latentním infekcím, zkrácení doby léčení a snížení frekvence dávkování. V současné době se v preklinické a klinické fázi vyskytuje několik strukturně obměněných nebo nových látek²². Ze struktury indolochinazolových alkaloidů byl připraven **tryptanthrin (XXV)**, který vykazuje zajímavou aktivitu proti MDR-TB ($\text{MIC} = 0.5\text{--}1.0\ \mu\text{g/ml}$)²³. Ze skupiny fluorochinolonů bych zmínil **RQ-10018 (XXVI)** a **ATB-250 (XXVII)**, které působí proti kmenům *M. tuberculosis* rezistentním na rifampicin i ethambutol. Dalšími novými látkami je například **BM 212 (XXVIII)** ze skupiny pyrrolu nebo ze skupiny nitroimidazopyranu²⁴ **PA-824 (XXIX)**, která je z této skupiny nejvýznamnější. Je aktivní proti latentním a replikujícím buňkám *M. tuberculosis* ($\text{MIC} = 0.015\text{--}25\ \mu\text{g/ml}$). Další látkou, která vykazuje zajímavou aktivitu *in vivo* proti řadě patogenním bakteriím, včetně gram-negativním a gram-pozitivním bakteriím a *M. tuberculosis*, je **thiolaktomycin**^{18, 25} (**XXX**). Jedná se o thiolaktamové antibiotikum a mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy mastných kyselin typu II (FAS-II) v bakteriálních a rostlinných buňkách.



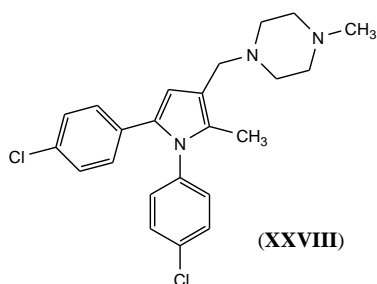
(XXV)



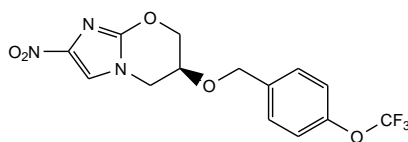
(XXVI)



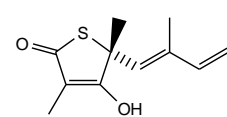
(XXVII)



(XXVIII)



(XXIX)



(XXX)

1.3 Biologická aktivita salicylanilidů a jejich analogů

Na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK se problematika salicylanilidů a jejich derivátů řeší řadu let. U připravených látek se studovala zejména antimykobakteriální a antitumorové aktivity.

1.3.1 Biologická aktivita salicylanilidů

Salicylanilidy jsou skupinou látek se širokým spektrem biologických aktivit, např. antibakteriální, antiparazitární, antifungální, antituberkulózní, anthelmintickou, herbicidní a protizánětlivou^{26, 27}. V minulosti byly široce používány v kosmetice, medicíně a technických oborech. Na přelomu 50. a 60. let minulého století se ukázalo, že halogenované, převážně tetrachlorované deriváty, vykazují alergenní účinek a vyvolávají fotokontaktní dermatitidu²⁸. V posledních letech se však salicylanilidy začaly znovu těšit větší pozornosti v souvislosti s jejich významnou biologickou aktivitou, která byla objasněna na molekulární úrovni.

Na konci 60. let minulého bylo zjištěno, že účinek salicylanilidů, např. anthelmintika niklosamidu [5-chlor-*N*-(2-chlor-4-nitrofenyl)salicylamid] spočívá v přerušení oxidativní fosforylace²⁹⁻³². Za účinek je zodpovědná slabě kyselá hydroxyskupina v poloze 2. Sloučenina obsahující místo nitroskupiny redukovanou formu aminoskupinu, nepřerušuje oxidativní fosforylaci a anthelmintický účinek vymizí³³. V roce 2003 byl nalezen inhibiční účinek niklosamidu na koronavirus, způsobující obávané onemocnění SARS. Byla popsána interakce salicylanilidů s proteázou tohoto viru, která má důležitou roli při replikaci proteinů, a tím se niklosamid řadí mezi potenciální léčiva proti SARS³⁴.

V roce 1998 byl zjištěn nový mechanismus účinku salicylanilidů, který je založen na inhibici dvoukomponentových regulačních systému bakterií^{35, 36}. Dvoukomponentové systémy se skládají z histidin-proteinkinasy (HPK) a DNA-vazebného proteinu, který je regulátorem odpovědi. Pro účinek je nezbytný salicylanilidový farmakofor elektronakceptorní substituent na salicylové části a hydrofobní skupina na anilinové části. Tento nový poznatek o mechanismu účinku byl sledován u klosantelu a tetrachlorsalicylanilidu. Vykazují významnou aktivitu proti gram-pozitivním patogenům, včetně methicilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MIC = 1 - 2 µg/l) a vankomycin-rezistentního *Enterococcus faecium* (MIC = 1 - 2 µg/l), což jsou kmeny, které představují velký klinický problém³⁷. Aktivace nebo

represe genů dvousložkovým regulačním systémem spočívá v navázání specifického ligandu na HPK a následné spuštění autofosforylace histidinového zbytku³⁸. Regulační systémy bakterií hrají důležitou roli v rozvoji virulence, patogeneze i rezistence bakterií vůči léčivům³⁹.

V nedávné době byl popsán účinek salicylanilidů na receptory protein-tyrosinkinasy pro epidermální růstový faktor⁴⁰ (EGFR PTK). Salicylanilidy působí jako ATP-kompetitivní inhibitory interakcí s aktivním místem EGFR, a proto se mohou stát novou skupinou látek pro terapii nádorů^{41, 42, 43}.

V roce 2004 byl popsán účinek salicylanilidů na iontové kanály, které ovlivňují tok vápenatých iontů do červených krvinek⁴⁴. Salicylanilidy i substituované 2-methoxybenzanilidy byly identifikovány jako aktivátory draslíkových kanálů (BK). Aktivátory BK by mohly účinně ovlivňovat nemoci spojené s nervovou a svalovou hyperexcitabilitou, jako např. astma, křeče, anxiozitu, hypertenzi, koronární onemocnění i vaskulární komplikace spojené s diabetem, při nichž dochází k inaktivaci vaskulárních kanálů BK vlivem snížené dostupnosti endogenního oxidu dusnatého a zvýšené produkce peroxynitritu⁴⁵.

Při výzkumu interleukinu (IL)-12p40, který je společnou podjednotkou IL-12 a IL-13, bylo zjištěno, že salicylanilidy inhibují produkci IL-12p40 v dendritických buňkách. To může mít význam v souvislosti s léčbou zánětlivých nemocí^{46, 47}.

Biologické aktivity látek obsahujících dvě fenolické hydroxyskupiny v acylové části, tj. dihydroxybenzanilidů, nejsou v literatuře často zmiňovány. Mezi anthelmintika používaná v praxi patří resorantel (*N*-(4-bromfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid)⁴⁸. Série salicylanilidů, na které byla studována inhibice dvoukomponentového regulačního systému bakterií, zahrnovala i dva 2,3-dihydroxybenzanilidy. Tyto deriváty byly silnými inhibitory autofosforylace KinA kinázy, ale měli jen střední MIC proti testovaným kmenům *Staphylococcus aureus* (MIC = 8/16 µg/l) a vankomycin-rezistentního *Enterococcus faecium* (MIC = 8/16 µg/l)³⁷.

Velmi málo informací se týkalo cyklických analogů dihydroxybenzanilidů. V souvislosti s vývojem nových anthelmintik (účinných proti tasemnicím) byly patentovány 3-(subst.fenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony (chlorované a bromované v acylové části), s významnou aktivitou vůči dermatofytu *Epidermophyton*⁴⁹. Jako fungicidy účinné proti původci významné houbové choroby

rýže *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*) byly patentovány 5-hydroxyderiváty připravené cyklizací z 2,6-dihydroxybenzanilidů⁵⁰.

1.3.2 Biologická aktivita thiosalicylanilidů

Izosterní náhradou kyslíku v salicylanilidech se získá velmi zajímavá a z biologického hlediska ne tolik prozkoumaná skupina thiosalicylanilidů. I když jejich antimykobakteriální aktivita⁵¹ je známa delší dobu, do popředí zájmu se dostaly až v posledních letech, kdy byla studována jejich antifungální⁵² a antimykobakteriální aktivita⁵³. Dokonce už byl proveden test *in vivo* na modelu experimentální tuberkulózy u 3', 4'-dichlorthiosalicylanilidu, ale ukázala se jeho neúčinnost⁵⁴. Skupina autorů pod vedením Dr. Kubicové v nedávné době připravila novou metodu velkou sérii různě substituovaných thiosalicylanilidů, jak v acylové, tak i v anilinové části molekuly, u kterých byla zjištěna zajímavá antifungální a antimykobakteriální aktivita *in vitro*. Výsledky byly patentovány^{55, 56}. Na základě testů *in vitro* byla zjištěna jejich vysoká antimykotická a antibakteriální aktivita.

Velmi zajímavých výsledků dosáhli polští autoři Niewiadomy a Matysiak se spolupracovníky, kteří se od roku 1997 zabývají deriváty obsahujícími pouze dvě hydroxyskupiny v acylové části, tj. 2,4-dihydroxythiobenzamidy. U látek byla zjištěna zajímavá inhibiční aktivita *in vitro* proti dermatofitům a kvasinkám^{57, 58}. Látky vykazovaly střední aktivitu proti plísním⁵⁹, kde byly testovány proti 4 houbovým kmenům. Nejvýznamnější fungistatickou aktivitu 3'-fluorderivát (MIC = 7.82 µg/ml proti *Scopulariopsis brevicalis*), jedná se o houbu poskytující onychomykózu. Velmi mnoho prací bylo věnováno fungicidnímu a fungistatickému vlivu těchto látek na fytopatogení houby⁶⁰⁻⁶². Autoři využívali chromatografické metody pro hodnocení lipofility, tak mohli studovat pomocí lineární regresní analýzy, jak na ní závisejí biologické aktivity⁶³⁻⁶⁵. Autoři připravili a testovali také deriváty, které měly v amidové části heterocyklické zbytky⁶⁶, případně deriváty odvozené od hydrazidů, hydrazinů, hydrazonů a semikarbazidů⁶⁷. Látky byly testovány proti houbě *Botrytis cinerea* a vykazovaly významné fungistatické vlastnosti. 2,4-Dihydroxythiobenzanilidy byly testovány i na antibakteriální aktivitu, z výsledků hodnocení 25 látek vyplynulo, že látky jsou účinné proti gram-pozitivním bakteriím [2,4-dihydroxy-*N*-(4-jodfenyl)thiobenzamid, MIC = 3.9 µmol/l], ale neúčinné proti gramnegativním bakteriím⁶⁸. Autoři také připravili deriváty, ve kterých thioamidová skupina byla součástí thiadiazolu nebo amidrazonu, a

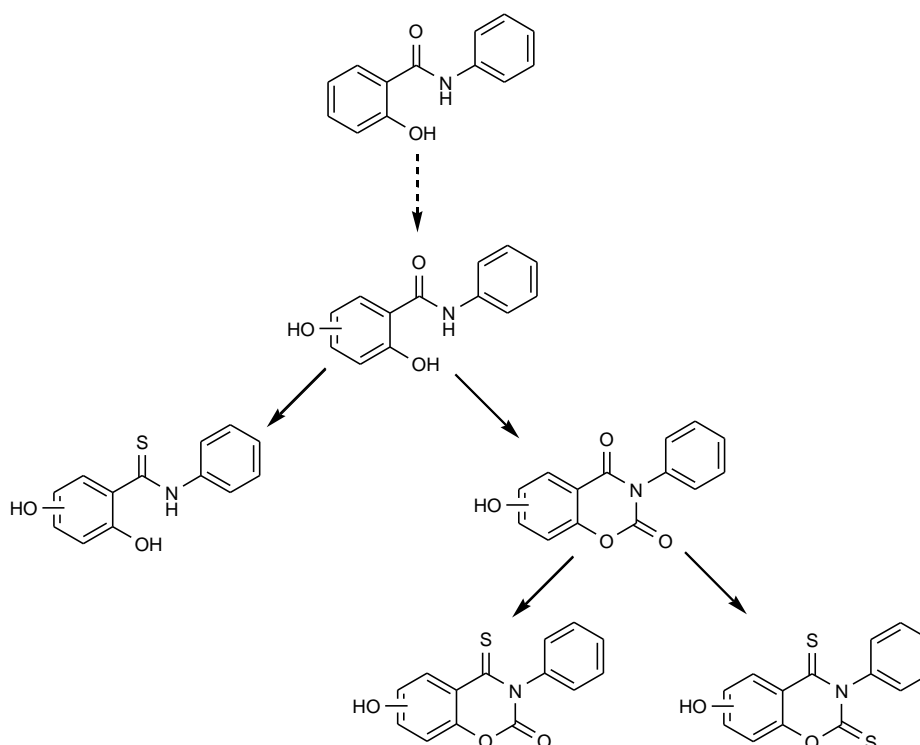
testovali jejich antifungální aktivitu. Připravené látky vykazovaly vynikající aktivitu proti dermatofytům a střední proti kvasinkám. Nejaktivnější byl 2-[5-(pyridyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]benzen-1,3-diol, který měl proti dermatofytům MIC = 0.44-0.99 µg/ml⁶⁹.

Byly provedeny i studie, zabývající se cytotoxicitou a toxicitou některých látek. U série studovaných látek byla nalezena nižší cytotoxicita⁷⁰, než u širokospektrého antimykotika enilkonazolu, použitého jako standardu. Cytotoxicita byla závislá na substituci v anilinové části molekuly a nejvyšší vykazovaly látky substituované halogeny. Nalezená toxicita byla relativně nízká u testovaných látek, LD₅₀ u myší byly v rozmezí 239-840.5 mg/kg⁷¹.

2 Cíl práce

Disertační práce je příspěvkem k výzkumu látek s antimykobakteriální a antifungální aktivitou odvozených od salicylanilidu. Cílem této práce je příprava derivátů, které obsahují dvě hydroxylové skupiny v acylové části, z nichž jedna je v poloze 2, a jejich cyklických analogů. Konkrétně se jedná o tyto skupiny látek:

- *N*-fenyl-dihydroxybenzamidy,
- *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidy,
- 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony,
- 3-fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-ony a 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony.



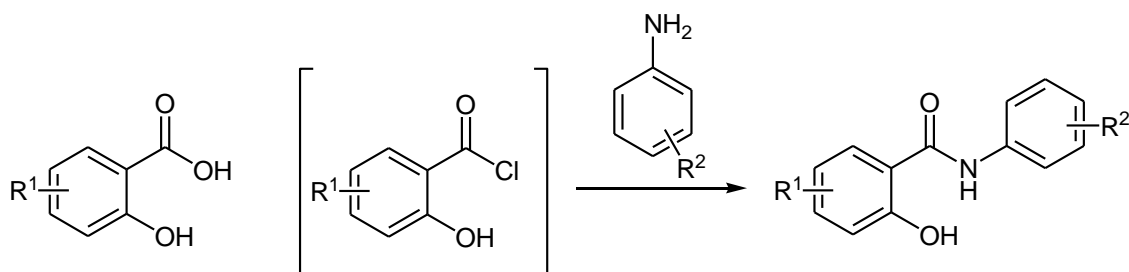
Součástí disertační práce je příprava 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionů, tj. dusíkatých analogů thioantranililidů.

U vybraných látek budou stanoveny jejich antimykobakteriální a antifungální aktivity. Získané výsledky budou diskutovány z hlediska vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou látek (SAR).

3 METODICKÁ ČÁST

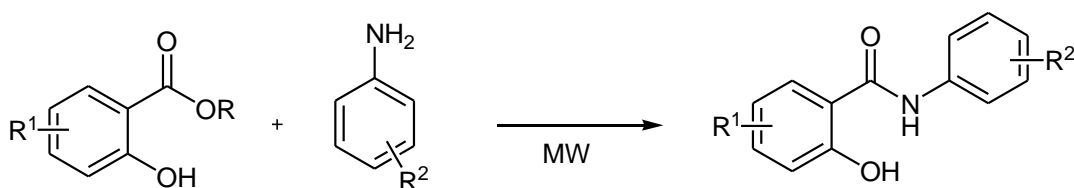
3.1 Příprava 2-hydroxybenzanilidů

2-Hydroxybenzanilidy lze připravit z kyseliny salicylové a odpovídajícího anilinu za různých reakčních podmínek. Sama o sobě je karboxylová kyselina málo reaktivní, a proto se používají různá činidla, která vytvoří nejprve reaktivní halogenid, obvykle chlorid, nebo se použije její ester. Pro přípravu chloridu se nejčastěji používá chlorid thionylu⁷²⁻⁷⁵, chlorid fosforitý⁷⁶⁻⁸⁷ nebo oxalyldichlorid⁸⁸. Jako rozpouštědlo se nejčastěji používal toluen, chlorbenzen, pyridin, tetrahydrofuran, xylen. Byly popsány i reakce v mikrovlnném reaktoru, u kterých se výrazně zkrátil reakční čas na 10 až 20 minut. Jako činidla bylo použito chloridu fosforitého a rozpouštědla toluenu⁸⁹ nebo chlorbenzenu⁹⁰.

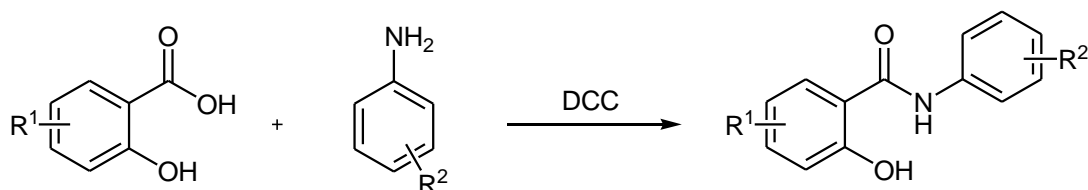


Jak již bylo zmíněno výše, je možno i vycházet z dalších funkčních derivátů, a to esterů salicylových kyselin. Lze použít jak alkylestery⁹¹⁻⁹³, případně s využitím komplexu jodid boritý—*N,N*-diethylanilin jako katalyzátoru⁹⁴, tak arylestery⁹⁵⁻⁹⁷. Arylestery jsou reaktivnější než alkylestery, protože fenolátový anion je dobře odstupující skupinou.

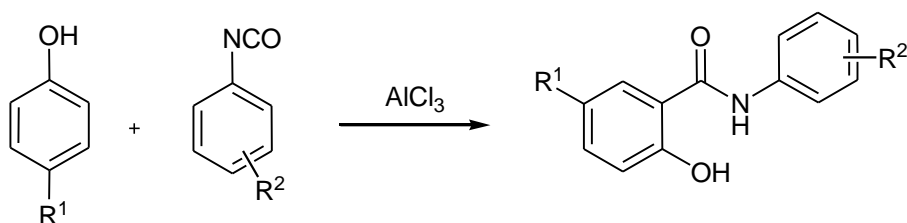
Skupina autorů ze Slovenska publikovala tzv. „solvent-free“ metodu prováděnou v mikrovlnném reaktoru⁹⁸. Reakční čas se pohyboval okolo 7 minut a výtěžky dosahovaly v průměru 90%.



Při přípravě 2-hydroxybenzanilidů se uplatnil i dicyklohexylkarbodiimid (DCC), činidlo velmi frekventované v chemii peptidů. Reakce je prováděna v dichlormetanu za laboratorní teploty⁹⁹.

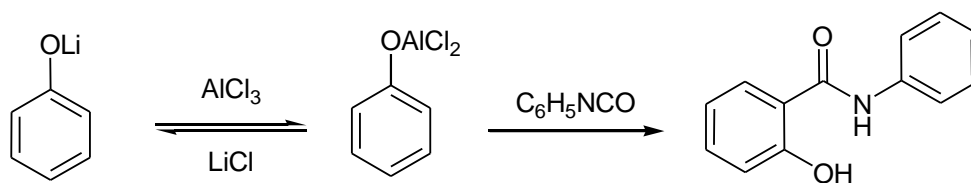


K přípravě 2-hydroxybenzanilidů byla také využita *ortho*-aminokarbonylace fenolů fenyloisokyanátem na principu Friedelovy-Craftsovy acylace za použití chloridu hlinitého jako katalyzátoru¹⁰⁰. Při této metodě záleží na uspořádání substituentů na fenolu, aby bylo docíleno substituce do polohy *ortho* vzhledem k hydroxyskupině v acylové části. Pokud je poloha *para* vůči hydroxylu zablokována, probíhá acylace přednostně do polohy *ortho* k hydroxylu.

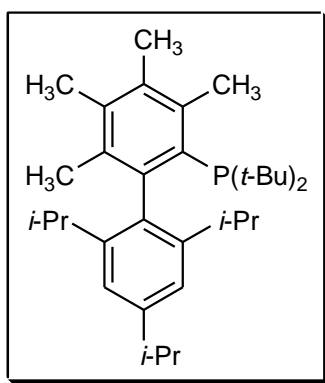
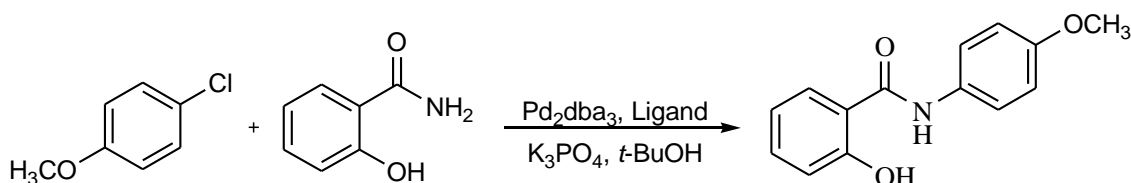


V posledních letech byly popsány analogické reakce, u kterých místo chloridu hlinitého byl jako katalyzátor použit chlorid boritý. Reakce byly prováděny v dichlormethanu nebo toluenu a je možno je provést bez použití^{101, 102} i s použitím mikrovlnného reaktoru¹⁰³.

Byla popsána také podobná syntéza 2-hydroxybenzanilidů z fenolů a fenyloisokyanátů, při které se navíc používá butyllithia¹⁰⁴. Při reakci nejprve reaguje fenol za laboratorní teploty s roztokem butyllithia v hexanu a chloridem hlinitým v xylenu. Poté se přidá roztok fenyloisokyanátu v xylenu a reakční směs se udržuje za varu po dobu 20 hodin. Reakce je ukončena přidáním 10% kyseliny chlorovodíkové. Použití natrium- nebo kalium-fenolátu místo lithné soli vede ke směsi produktů.



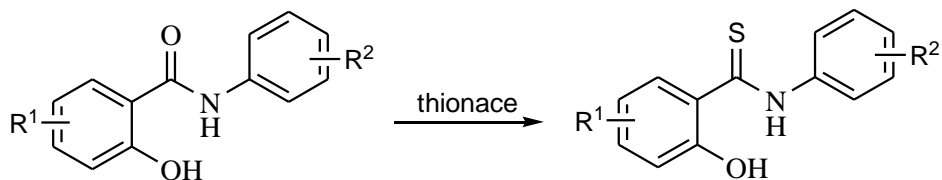
Nedávno byla popsána kaplingová syntéza amidů z arylchloridů a primárních amidů. Při této reakci se k přímé amidaci používá palladiový katalyzátor $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ a ligand na bázi dialkyl(biaryl)fosfinu. Jako báze se v případě této reakce nejlépe¹⁰⁵ osvědčil fosforečnan draselný a rozpouštědlo *tert*-butanol. Výtěžek níže uvedené reakce byl 99 %.



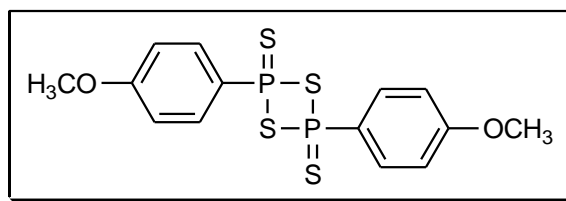
Ligand

3.2 Příprava 2-hydroxythiobenzanilidů

Nejobecnějším přístupem k přípravě 2-hydroxythiobenzanilidů je thionace jejich kyslíkatých analogů 2-hydroxybenzanilidů. K thionaci je možno použít různá thionací činidla, převážně se používá sulfid fosforečný P_4S_{10} ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ nebo Lawessonovo činidlo (2,4-bis(4-methoxyfenyl)-1 λ^5 ,3 λ^5 ,2,4-dithiadifosfetan-2,4-dithion)¹⁰⁹.



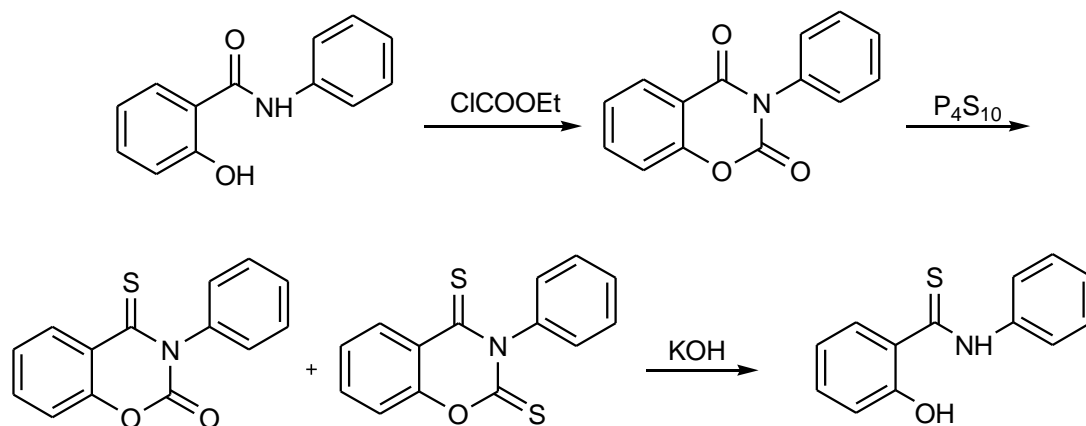
Přímou thionací 2-hydroxybenzanilidů nebylo docíleno uspokojivých výsledků, a to ani za použití P_4S_{10} ¹¹⁰ ani Lawessonova činidla¹¹¹⁻¹¹³. Pomocí přímé thionace bylo docíleno nízkých výtěžků a v případě použití Lawessonova činidla obsahuje reakční směs vedlejší produkty vzniklé rozkladem činidla nebo jeho reakcí s výchozí látkou či produktem.



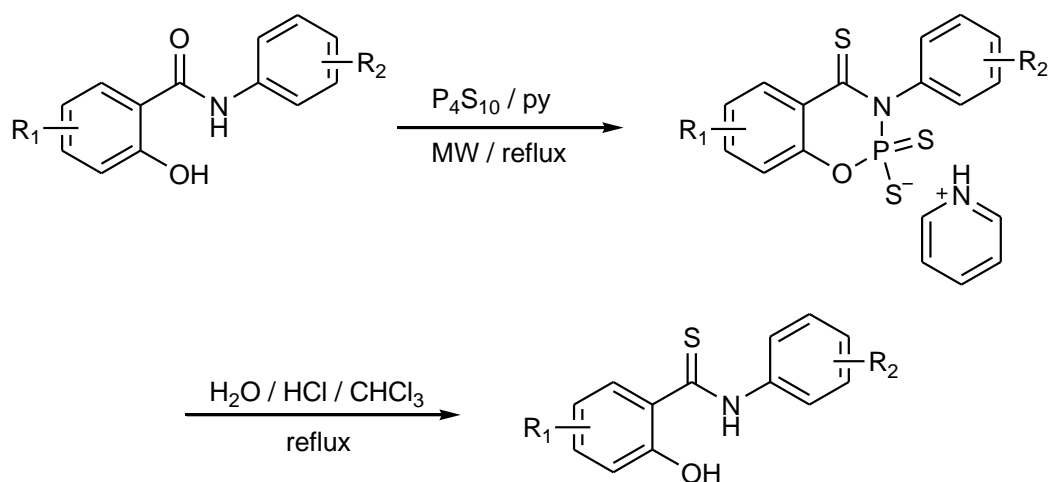
Lawessonovo činidlo

Při přípravě 2-hydroxythiobenzanilidů thionací se musí přihlížet k přítomnosti hydroxyskupiny v poloze 2, která omezuje využití některých reakcí, a proto musíme využít jiné postupy, např. chránění hydroxyskupiny.

Jednou z možností je její chránění pomocí esteru kyseliny chlormravenčí za vzniku odpovídajícího 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu. Jeho thionací pomocí P_4S_{10} ^{114, 115} dochází ke vzniku mono- a disirného analogu, jejichž následnou bazickou hydrolýzou se získá žádaný 2-hydroxythiobenzanilid. Tato metoda byla již popsána v 70 letech minulého století Wagnerem¹¹⁶, kdy thionaci prováděl tavením 3-fenyl-1,3-benzoxazinového meziproductu s P_4S_{10} . Truong¹¹⁷ a kolektiv popsali v roce 2005 podobnou strategii, kdy thionaci neprováděli tavením, ale zahříváním meziproductu s P_4S_{10} v dioxanu po dobu 2 hodin.

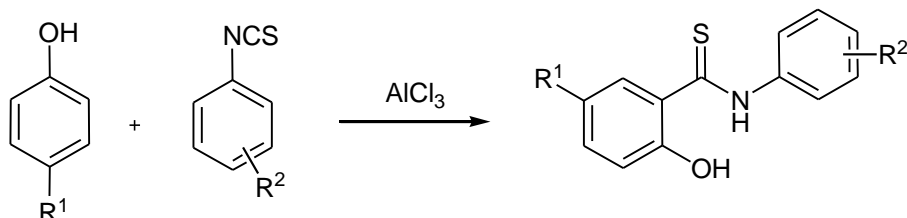


V posledních letech jsme patentovali novou metodu přípravy 2-hydroxythiosalicylanilidů^{55, 56}. Jedná se o dvoustupňovou reakci, kdy v prvním kroku reaguje salicylanilid s P_4S_{10} v pyridinu, za vzniku pyridinium-3-fenyl-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ⁵-benzoxazafosfinin-2-thiolátu jako meziprojektu. Je-li reakce prováděna v mikrovlnném reaktoru, dochází k výraznému zkrácení reakční doby z 8 hodin až na 45-60 minut. V následujícím kroku probíhá kyselá hydrolýza pyridinové soli ve směsi vody a toluenu (nebo chloroformu). Místo P_4S_{10} je možné použít i Lawessonovo činidlo, které je ale méně výhodné. Tato syntéza byla použita i v případě syntézy *N*-benzylthiosalicylanilidů¹¹⁸.

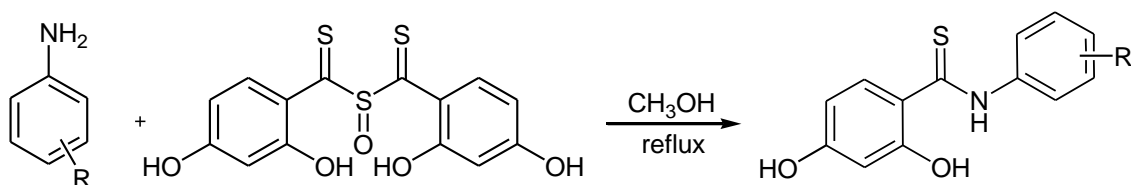


Pro přípravu 2-hydroxythiobenzamidů lze aplikovat i Friedelovy-Craftsovy acylace za použití fenylisothiokyanátu. Tato metoda opět dovolu je připravit pouze určitou škálu produktů. Důležitým faktorem je „vhodně“ substituovaný fenol, aby k acylaci fenylisothiokyanátem docházelo do polohy *ortho* vzhledem k hydroxyskupině.

Jako katalyzátor se nejčasněji používá chlorid hlinitý a rozpouštědlo nitromethan. Tyto reakce již byly rozšířené v 80. letech 19. století¹¹⁹⁻¹²¹ a později bylo na ně navázáno¹²². Skupinou autorů z Polska byly prováděny acylace na 1,3-dihydroxybenzeny a jejich alkylované deriváty. Při syntéze používali jako katalyzátor i $\text{BF}_3 \cdot 2\text{CH}_3\text{COOH}$ ¹²³



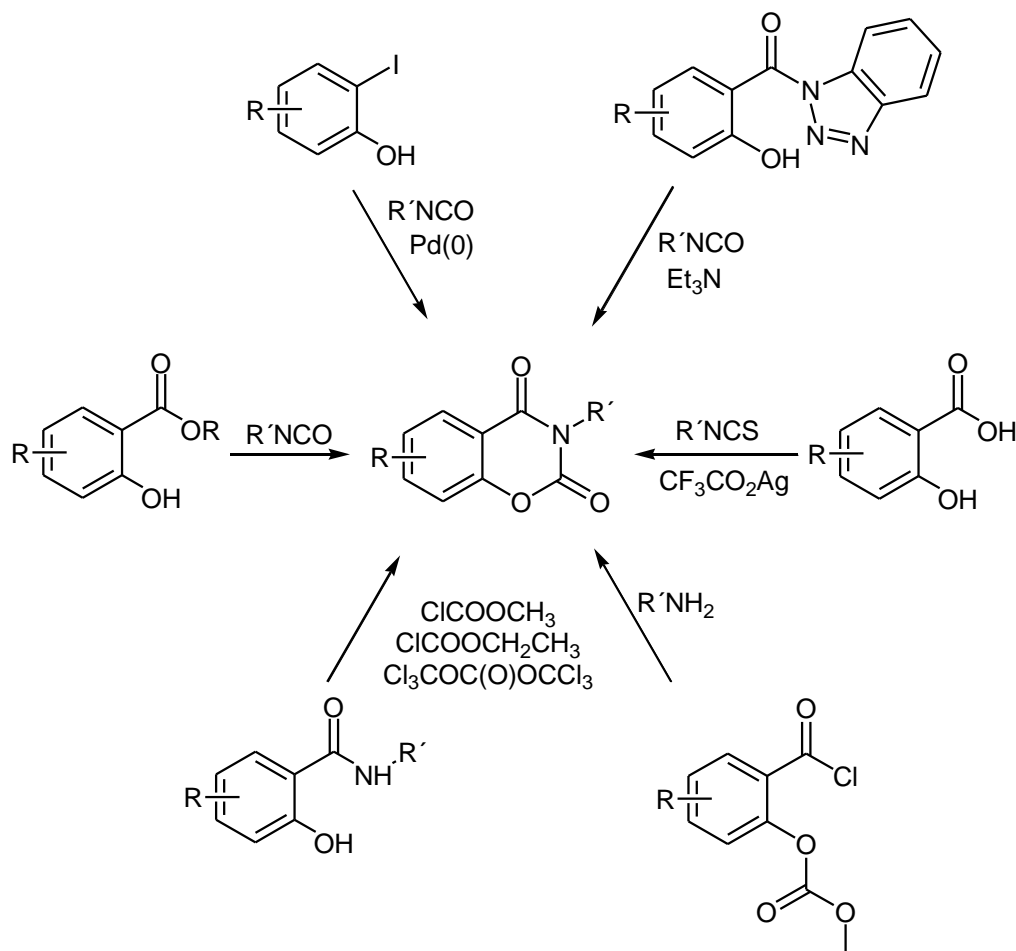
Selektivně k přípravě substituovaných 2,4-dihydroxythiobenzanilidů byla popsána metoda, které využívá jako činidlo sulfinylbis[(2,4-dihydroxyfenyl)methan-thion]. Toto činidlo snadno reaguje i s aromatickými aminy za vzniku thioamidů. Reakci je prováděna zahříváním v methanolu po dobu 3 hodin^{124, 125}.



Činidlo sulfinylbis[(2,4-dihydroxyfenyl)methan-thion] se připravuje dvoustupňovou reakcí¹²⁶. V prvním kroku se zahřívá resorcinol se sirouhlíkem v ethanolu s KOH a po následném okyselení vzniká 2,4-dihydroxydithiobenzoová kyselina jako meziprodukt. Následující krok probíhá po dobu 4 hodin v etheru, kdy jako reakční komponenty se používají thiofosgen a oxid uhličitý.

3.3 Příprava 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

Přehled metod pro přípravu 3-substituovaných 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů podává následující schéma, upravené podle práce¹²⁷.



K přípravě 3-substituovaných 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů můžeme využít cyklizační reakce odpovídajících 2-hydroxybenzamidů s methyl-¹²⁸, ethyl-¹²⁹⁻¹³⁵, isopropyl-chlorformiáty¹³⁶ anebo trifosgenem⁸⁰. Jako báze se používá pyridin a triethylamin. Tyto reakce se uplatnily pro chránění hydroxyskupiny při přípravě 2-hydroxythiobenzamidů (viz výše).

Velmi zajímavou metodu, při níž se využívá palladiem katalyzované cyklokarbonylace 2-jodfenolů s fenylisokyanáty za přítomnosti oxidu uhelnatého, popsal Larksarp¹³⁷. Jako katalyzátor je použit $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ a 1,4-bis(difenylfosfino)butan (dppb) v poměru 1:2. Autoři předpokládají, že nejprve vzniká arylester karbamové kyseliny, který vstupuje do katalytického cyklu.

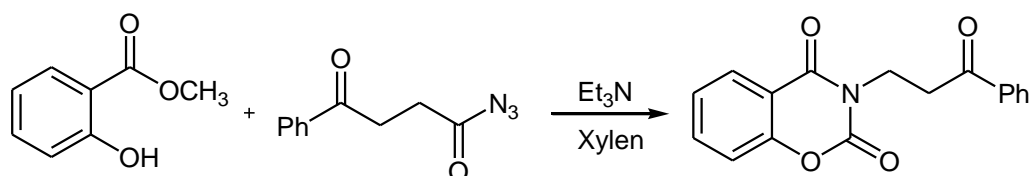
Pokud vycházíme přímo z kyseliny salicylové, můžeme 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony připravit pomocí fenylisothiokyanátu za přítomnosti stříbrných iontů¹³⁸. Jedná se o cyklizačně-desulfurační reakci, prováděnou v acetonitrilu za použití triethylaminu jako báze.

Další možností je převedení výchozí salicylové kyseliny na *N*-(*o*-hydroxyaroyl)benzotriazol. To se provádí reakcí salicylové kyseliny s benzotriazolem a SOCl_2 v tetrahydrofuranu za laboratorní teploty. Ve druhém kroku reaguje s 2.2 ekv. fenylisokyanátu a 3 ekv. triethylaminu¹²⁷. Menší nevýhodou této metody je, že při tomto poměru reagentů kromě kvantitativního výtěžku odpovídajícího 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu obdržíme i příslušný karbamoylbenzotriazol jako vedlejší produkt.

Isokyanátů můžeme využít i při reakci s estery kyseliny salicylové. Při reakci můžeme vycházet z alkyl-¹³⁹ a fenylesterů¹⁴⁰.

Další možnost přípravy představuje reakce substituovaného aminu a 2-(methoxykarbonyloxy)benzoylchloridu¹⁴¹. Reakce je využívána v chemii antibiotik¹⁴².

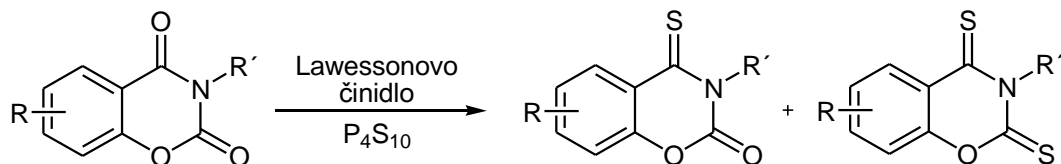
K přípravě řady heterocyklických sloučenin se využívají azidy kyselin. Na příklad byla popsána reakce 1-azido-4-fenylbutan-1,4-dionu s metyl-salicylátem¹⁴³.



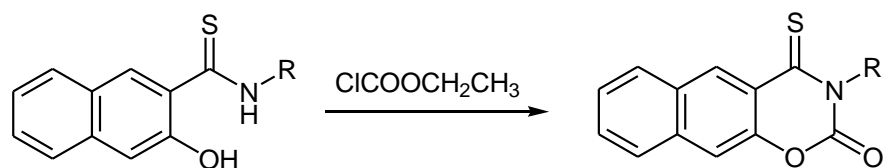
Pro přípravu 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů by se jako výchozí látka dal použít odpovídající benzoylchlorid, z něž by se připravil azid, který v průběhu reakce poskytuje Curtiovým přesmykem isokyanát.

3.4 Příprava 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů a jejich monosírných analogů

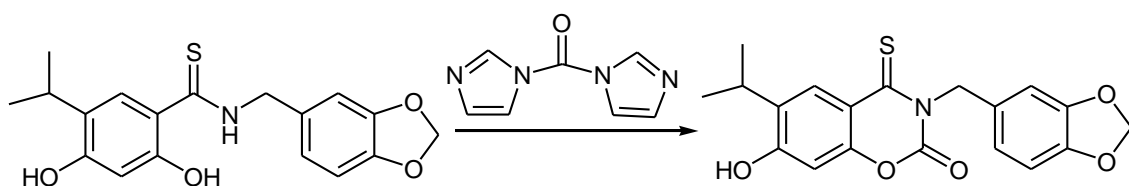
Jedním ze způsobů, kdy lze v jednom reakčním kroku připravit vedle sebe jak 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony, tak jejich monosírná analoga 4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony, je tavení 2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů thionačním činidlem. Používá se sulfid fosforečný^{114, 115, 144} a reakce se provádí přímým tavením reakčních komponent při teplotě 175 - 200 °C po dobu 20 minut. Výsledná reakční směs je následně čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu, kdy první je izolován disírný derivát (vyšší R_f) a poté monosírný derivát (nižší R_f).



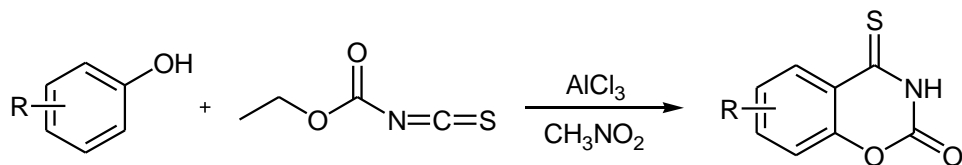
Vznik monosírného a disírného analogu thionací pomocí sulfidu fosforečného byl popsán již v roce 1974 Wagnerem¹⁴⁵. V téže publikaci je uvedena i reakce thioamidu kyseliny 3-hydroxy-2-naftoové s ethyl-chlorformiátem použitá pro prokázání struktury monosírného produktu, totiž že thioxoskupina je v poloze 4.



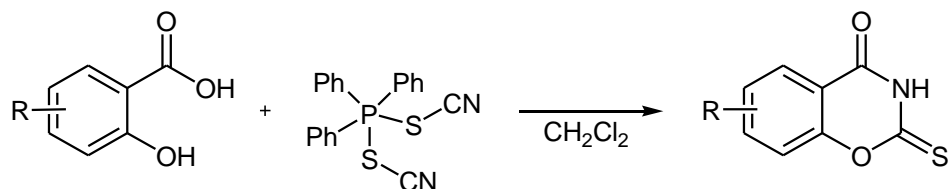
Další reakce pro přípravu monosírného derivátu s thioxoskupinou v poloze 4 vychází opět z příslušného 2-hydroxythiobenzamidu, ale místo ethyl-chlorformiátu je použito jako cyklizačního činidla bis(imidazol)karbonylu¹⁴⁶. Reakce je prováděna po dobu 30 minut za laboratorní teploty.



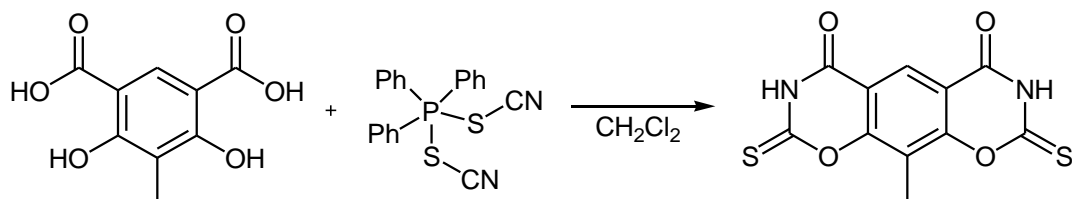
Friedelova-Craftsova acylace substituovaných fenolů pomocí *O*-ethyl-karbonisothiokyanatidátu vede k derivátům 4-thio-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onu. Reakce je prováděna v nitromethanu za katalýzy chloridem hlinitým¹⁴⁷.



Pro přípravu analogů s thioxoskupinou v poloze 2, tzn. derivátů 2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-1,3-benzoxazin-4(3*H*)-onu, lze s výhodou použít reakci substituované salicylové kyseliny s $\text{Ph}_3\text{P}(\text{SCN})_2$. Činidlo se připravuje *in situ* a jako rozpouštědlo byl použit dichlormethan¹⁴⁸.



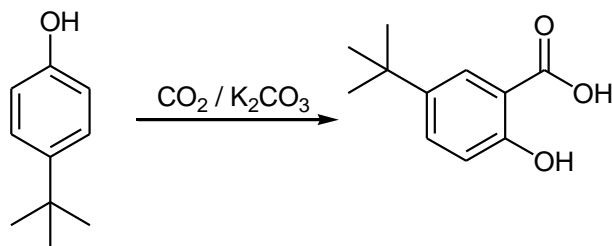
Tato reakce byla nedávno použita k přípravě 8-methyl-2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-1,3-benzoxazin-4-onu¹⁴⁹. a „zdvojeného“ analogu 10-methyl-2,8-dithioxo-2,3,7,8-tetrahydro-4*H*,6*H*-benzo[1,2-*e*;5,4-*e'*]bis[1,3]oxazin-4,6-dionu¹⁵⁰.



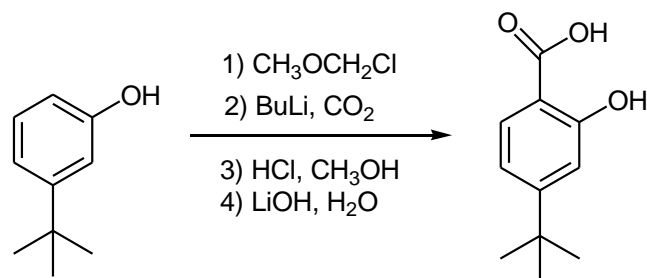
3.5 Příprava *tert*-butylderivátů salicylové kyseliny

3.5.1 Příprava mono-*tert*-butylderivátů salicylové kyseliny

Salicylová kyselina substituovaná v poloze 5 *tert*-butylovou skupinou se připravuje z 4-*tert*-butylfenolu Kolbeho-Schmidtovou reakcí¹⁵¹ nebo analogickou reakcí s oxidem uhličitým za bazické katalýzy K_2CO_3 ¹⁵².

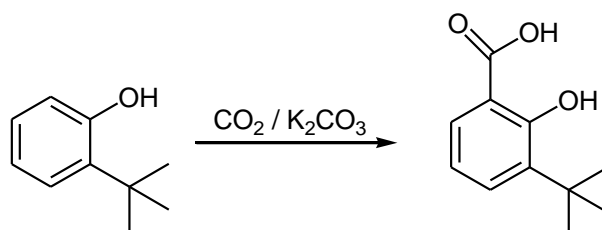


V literatuře popsaná metoda vedoucí ke 4-*tert*-butylsalicylové kyselině je sledem reakcí vycházejícím z 3-*tert*-butylfenolu¹⁵³. V prvním kroku dochází k chránění hydroxyskupiny (chlormethoxy)methanem a následně reakcí s BuLi a CO_2 dochází k inserci karboxylu do jádra. V posledním kroku dochází k odchránění hydroxyly a hydrolýze methylesteru na odpovídající kyselinu.

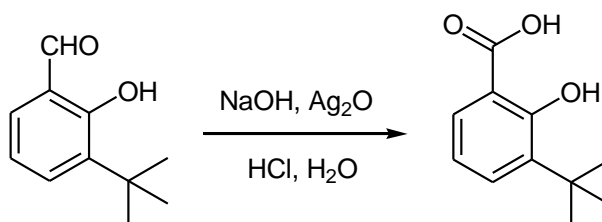


Další možností zavedení CO_2 je využití fotokatalytického katalyzátoru poly(3-hexylthiofenu). K reakci dochází pomocí ozařování viditelným světlem na film poly(3-hexylthiofenu) ponořený v ethanolu s 3-*tert*-butylfenolem pod CO_2 atmosférou¹⁵⁴.

K přípravě 3-*tert*-butylsalicylové kyseliny není příliš vhodná reakce 2-*tert*-butylfenolu s CO_2 z důvodu sterických a elektronických. Při reakci s CO_2 za bazické katalýzy K_2CO_3 bylo dosaženo pouze 3% výtěžku¹⁵¹.



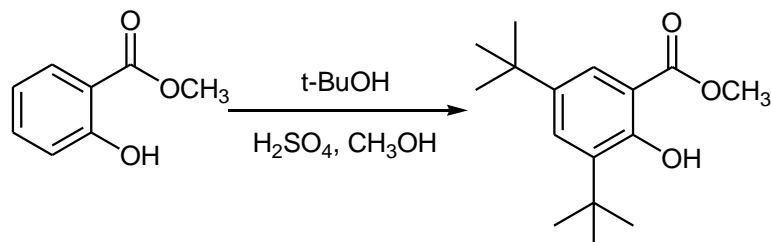
Metoda používaná k přípravě 3-*tert*-butylsalicylové kyseliny vychází z odpovídajícího karbaldehydu, který reakcí s oxidem stříbrným v bazickém prostředí poskytne po následném okyselení odpovídající karboxylovou kyselinu¹⁵⁵.



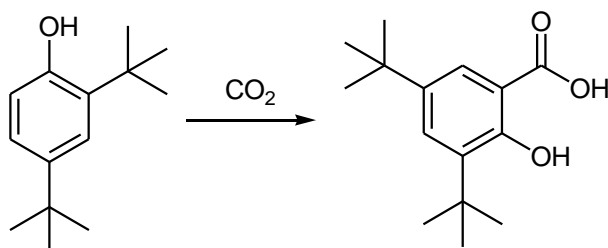
3.5.2 Příprava di-*tert*-butylderivátů salicylové kyseliny

Jeden ze způsobů přípravy di-*tert*-butylderivátů salicylových kyselin vychází z klasické Friedelovy-Craftsovy alkylace methyl-salicylátu pomocí *tert*-butanolu za katalýzy silnou minerální kyselinou^{156, 157} i bez ní^{158, 159}. Reakce podle orientace

aktivující skupiny probíhá do poloh 3 a 5 vzhledem ke karboxylu. Následnou bazickou hydrolýzou obdržíme odpovídající kyselinu.



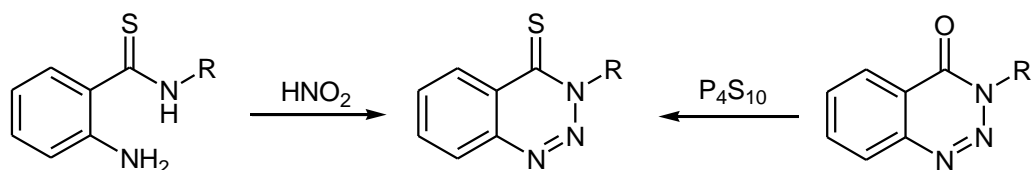
Opačnou možností přípravy di-*tert*-butylderivátů salicylových kyselin je zavedení karboxylové skupiny reakcí s CO_2 s 2,4-di-*tert*-butylfenolem. Reakce je analogií Kolbeho-Schmittovy reakce¹⁶⁰⁻¹⁶⁵.



3.6 Příprava 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionů

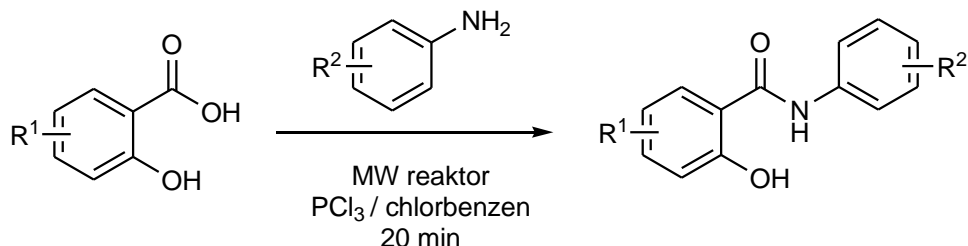
K přípravě 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionů můžeme zvolit dva přístupy. První možností je nejprve připravit 2-aminothiobenzamid^{166, 167}, který při diazotaci následně samovolně cyklizuje na odpovídající 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thion¹⁶⁸.

Druhou možností je opačný postup, nejprve připravit 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-on jako výchozí látku, která se pomocí thionačního činidla P_4S_{10} převede na žádaný produkt¹⁶⁹. Výchozí 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-on lze snadno připravit diazotací a následnou cyklizací z příslušného antranilamidu^{170, 171}.

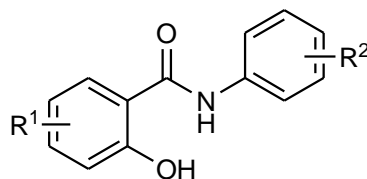


4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Příprava *N*-fenyl-dihydroxybezamidů



Do destilační baňky byla předložena směs výchozí dihydroxybenzoové kyseliny (20 mmol) a odpovídajícího anilinu (30 mmol) ve 120 ml chlorbenzenu. Ke směsi byl přidán PCl₃ (0.87 ml, 10 mmol) a směs byla ihned vložena do mikrovlnného reaktoru, kde byla za míchání při výkonu 600 W zahřívána po dobu 20 minut. Směs byla poté ochlazená a odpařena do sucha za sníženého tlaku. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze aceton-hexan (1:5). Produkt byl rekrystalován ze směsi ethanol-voda. Přehled připravených derivátů viz Tabulka č. 1.



	R ¹		R ²		R ²
1	3-OH	a	H	h	4-C(CH ₃) ₂
2	4-OH	b	4-Cl	i	4-[CH ₂] ₃ CH ₃
3	5-OH	c	4-F	j	4-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
4	6-OH	d	4-CH ₃	k	4-CH ₂ C ₆ H ₅ *
5	3-OCH ₃	e	3-CH ₃		
6	6-OCH ₃	f	4-OCH ₃		
7	3,4-OH	g	4-CH ₂ CH ₃		

* Substituent na *N* místo fenylu

Tabulka č. 1: Přehled připravených *N*-fenyl-dihydroxybezamidů

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
1a	3-OH	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃ 229.24	113-114	75
1b	3-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃ 263.68	137-139 (147 ¹⁷²)	69
1d	3-OH	4-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ 243.26	161-163	81
1f	3-OH	4-OCH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄ 259.26	129-130	77
1g	3-OH	4-CH ₂ CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ 257.28	115-116.5	71
1h	3-OH	4-C(CH ₃) ₂	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃ 271.31	113-14.5	69
2a	4-OH	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃ 229.24	131-134 (129-132 ¹⁰⁴)	66
2b	4-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃ 263.68	166-168	55
2d	4-OH	4-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ 243.26	164-166 (178-9 ¹⁷³)	71
2f	4-OH	4-OCH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄ 259.26	191-193 (198 ¹⁷³)	62
2h	4-OH	4-C(CH ₃) ₂	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃ 271.31	166-168 (172 ¹⁷⁴)	58
3a	5-OH	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃ 229.24	176-178 (160-3 ¹⁷⁵ , 184 ¹⁷⁶)	58

Tabulka č. 1: pokračování

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
3b	5-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃ 263.68	204-207 (247 ¹⁷⁷)	59
3d	5-OH	4-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ 243.26	208-210 (lit. ¹⁷⁸)	71
3f	5-OH	4-OCH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄ 259.26	113-114 (114-5 ¹⁷⁹)	63
3g	5-OH	4-CH ₂ CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ 257.28	190-192	61
4a	6-OH	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃ 229.24	195-197 (196 ¹⁸⁰)	72
4b	6-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃ 263.68	225-228 (224 ⁴⁸)	63
4c	6-OH	4-F	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃ 247.22	225-227 (224-5 ¹⁸¹)	74
4d	6-OH	4-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ 243.26	201-203 (198-9 ¹⁸²)	76
4e	6-OH	3-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ 243.26	197-199	61
4f	6-OH	4-OCH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄ 259.26	213-215 (213-4 ¹⁸²)	55
4i	6-OH	4-[CH ₂] ₃ CH ₃	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃ 285.34	157-158,5	72
4k	6-OH	4-CH ₂ C ₆ H ₅ *	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ 243.26	154-156 (lit. ^{183, 184})	76
5d	3-OCH ₃	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ 257.28	186-188	69

Tabulka č. 1: pokračování

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
6d	6-OCH ₃	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ 257.28	108-110	74
6d	6-OCH ₃	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ 257.28	108-110	74
7b	3,4-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₄ 279.68	126-128 (lit. ¹⁸⁵)	36
7d	3,4-OH	4-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄ 259.26	174-176	31

* Substituent na *N* místo fenylu***N*-Fenyl-2,3-dihydroxybenzamid (1a).**

ir (KBr): (C=O) 1642 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 6.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H*-5), 6.99 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H*-4), 7.12-7.18 (m, 1 H, *H*-4'), 7.34-7.40 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.45 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H*-6), 7.67-7.72 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.43 (bs, 1 H, *OH*), 10.36 (bs, 1 H, *OH*), 11.69 (bs, 1 H, *NH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 117.2, 118.6, 118.7, 119.2, 121.5, 124.6, 128.9, 138.2, 146.4, 148.6, 168.0. Elementární analýza (%) pro C₁₃H₁₁NO₃, Vypočteno: C, 68.11; H, 4.84; N, 6.11. Nalezeno: C, 68.23; H, 4.96; N, 6.22.

***N*-(4-Chlorfenyl)-2,3-dihydroxybenzamid (1b).**

ir (KBr): (C=O) 1647 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 6.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H*-5), 6.98 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H*-4), 7.39 (d, *J* = 1.5 Hz, 1 H, *H*-6), 7.40-7.46 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.70-7.77 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.46 (bs, 1 H, *OH*), 10.43 (bs, 1 H, *OH*), 11.46 (bs, 1 H, *NH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 117.5, 118.6, 118.7, 119.2, 122.9, 128.1, 128.8, 137.3, 146.4, 148.3, 167.9. Elementární analýza (%) pro C₁₃H₁₀ClNO₃, Vypočteno: C, 59.22; H, 3.82; N, 5.31. Nalezeno: C, 59.41; H, 3.96; N, 5.36.

2,3-Dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (1d).

ir (KBr): (C=O) 1643 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 2.26 (s, 3 H, CH_3), 6.41 (t, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-5$), 6.76 (d, $J = 2.1$ Hz, 2 H, $H-4$, $H-6$), 7.08-7.15 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.59-7.66 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 9.56 (bs, 2 H, OH), 10.00 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 20.7, 117.1, 118.3, 119.1, 119.5, 120.9, 124.7, 128.3, 138.7, 146.6, 148.9, 168.5. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_3$, Vypočteno: C, 69.12; H, 5.39; N, 5.76. Nalezeno: C, 69.31; H, 5.52; N, 5.88.

***N*-(4-Ethylfenyl)-2,3-dihydroxybenzamid (1g).**

ir (KBr): (C=O) 1638 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 1.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, CH_3), 2.53 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 6.69 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-5$), 6.89 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.26-7.35 (m, 3 H, $H-3'$, $H-5'$, $H-6$), 7.61-7.68 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 9.93 (bs, 2 H, OH), 10.31 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 14.9, 27.6, 117.0, 118.1, 119.2, 119.3, 121.0, 124.4, 127.9, 138.5, 145.9, 148.6, 168.2. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3$, Vypočteno: C, 70.02; H, 5.88; N, 5.44. Nalezeno: C, 69.87; H, 5.96; N, 5.30.

2,3-Dihydroxy-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (1f).

ir (KBr): (C=O) 1640 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 3.75 (s, 3 H, OCH_3), 6.76 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-5$), 6.91-6.98 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 6.98 (d, $J = 1.5$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.45 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.54-7.61 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 9.35 (bs, 1 H, OH), 10.25 (bs, 1 H, OH), 11.93 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 55.4, 114.0, 116.6, 118.2, 118.5, 119.2, 123.4, 131.0, 146.4, 149.1, 156.3, 168.0. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$, Vypočteno: C, 64.86; H, 5.05; N, 5.40. Nalezeno: C, 64.98; H, 5.20; N, 5.44.

2,3-Dihydroxy-*N*-(4-isopropylfenyl)benzamid (1h).

ir (KBr): (C=O) 1644 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 1.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$), 2.87 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1 H, CH), 6.77 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-5$), 6.98 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.21-7.26 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.46 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.56-7.61 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.29 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 15.1, 24.2, 107.9, 109.4, 109.5, 110.2, 112.7, 117.6, 126.8, 135.7, 137.4, 139.8, 159.0. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$, Vypočteno: C, 70.83; H, 6.32; N, 5.16. Nalezeno: C, 70.97; H, 6.20; N, 5.24.

***N*-Fenyl-2,4-dihydroxybenzamid (2a).**

ir (KBr): (C=O) 1635 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 6.34 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, *H*-3), 6.39 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.7 Hz, 1 H, *H*-5), 7.08-7.15 (m, 1 H, *H*-4'), 7.31-7.39 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.64-7.70 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, *H*-6), 10.15 (bs, 1 H, *OH*), 10.20 (bs, 1 H, *OH*), 12.28 (bs, 1 H, *NH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 103.1, 107.7, 108.0, 121.4, 124.2, 128.9, 130.6, 138.4, 161.9, 162.8, 167.5. Elementární analýza (%) pro C₁₃H₁₁NO₃, Vypočteno: C, 68.11; H, 4.84; N, 6.11. Nalezeno: C, 68.26; H, 5.02; N, 6.19.

***N*-(4-Chlorfenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (2b).**

ir (KBr): (C=O) 1647 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 6.33 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, *H*-3), 6.38 (dd, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, 1 H, *H*-5), 7.36-7.43 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.69-7.75 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, *H*-6), 10.23 (bs, 2 H, *OH*), 12.14 (bs, 1 H, *NH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 103.0, 107.8, 108.0, 122.8, 127.8, 128.8, 130.7, 137.5, 161.7, 162.8, 167.5. Elementární analýza (%) pro C₁₃H₁₀ClNO₃, Vypočteno: C, 59.22; H, 3.82; N, 5.31. Nalezeno: C, 59.38; H, 4.05; N, 5.39.

2,4-Dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (2d).

ir (KBr): C=O) 1636 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 2.27 (s, 3 H, CH₃), 6.31 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, *H*-3), 6.36 (dd, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, 1 H, *H*-5), 7.12-7.20 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.51-7.57 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, *H*-6), 10.01 (bs, 1 H, *OH*), 10.17 (bs, 1 H, *OH*), 12.36 (bs, 1 H, *NH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 20.7, 103.1, 107.6, 107.8, 121.5, 129.3, 130.4, 133.3, 135.8, 162.0, 162.7, 167.5. Elementární analýza (%) pro C₁₄H₁₃NO₃, Vypočteno: C, 69.12; H, 5.39; N, 5.76. Nalezeno: C, 69.36; H, 5.49; N, 5.82.

2,4-Dihydroxy-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (2f).

ir (KBr): (C=O) 1640 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 3.74 (s, 3 H, OCH₃), 6.31 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, *H*-3), 6.37 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.7 Hz, 1 H, *H*-5), 6.90-6.96 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.52-7.58 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, *H*-6), 10.04 (bs, 1 H, *OH*), 10.17 (bs, 1 H, *OH*), 12.47 (bs, 1 H, *NH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 55.4, 103.1, 107.5, 107.6, 114.0, 123.1, 130.1, 131.02, 156.1, 162.3, 162.7, 167.6. Elementární analýza (%)

pro $C_{14}H_{13}NO_4$, Vypočteno: C, 64.86; H, 5.05; N, 5.40. Nalezeno: C, 65.03; H, 5.14; N, 5.43.

2,4-Dihydroxy-*N*-(4-isopropylfenyl)benzamid (2h).

ir (KBr): (C=O) 1636 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 1.18 (d, $J = 6.9\text{ Hz}$, 6 H, $2\times\text{CH}_3$), 2.87 (hept, $J = 6.9\text{ Hz}$, 1 H, CH), 6.31 (d, $J = 2.4\text{ Hz}$, 1 H, $H-3$), 6.36 (dd, $J = 2.4\text{ Hz}$, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1 H, $H-5$), 7.18-7.23 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.54-7.58 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.89 (d, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1 H, $H-6$), 10.09 (bs, 1 H, NH), 10.18 (bs, 1 H, OH), 12.37 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 24.2, 33.1, 103.0, 107.6, 107.8, 121.5, 126.6, 130.3, 136.0, 144.4, 162.0, 162.7, 167.6. Elementární analýza (%) pro $C_{16}H_{17}NO_3$, Vypočteno: C, 70.83; H, 6.32; N, 5.16. Nalezeno: C, 70.71; H, 6.41; N, 5.27.

***N*-Fenyl-2,5-dihydroxybenzamid (3a).**

ir (KBr): (C=O) 1635 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 7.02 (d, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1 H, $H-3$), 7.10-7.17 (m, 1 H, $H-4'$), 7.22 (dd, $J = 2.7\text{ Hz}$, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1 H, $H-4$), 7.34-7.41 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.67-7.74 (m, 3 H, $H-6$, $H-2'$, $H-6'$), 9.78 (bs, 1 H, OH), 10.40 (bs, 1 H, OH), 11.79 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 118.1, 118.3, 121.0, 122.0, 124.5, 127.4, 129.0, 138.3, 142.6, 155.6, 169.7. Elementární analýza (%) pro $C_{13}H_{11}NO_3$, Vypočteno: C, 68.11; H, 4.84; N, 6.11. Nalezeno: C, 68.23; H, 4.91; N, 6.20.

***N*-(4-Chlorfenyl)-2,5-dihydroxybenzamid (3b).**

ir (KBr): (C=O) 1635 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 6.82 (d, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1 H, $H-3$), 6.88 (dd, $J = 2.7\text{ Hz}$, $J = 9.0\text{ Hz}$, 1 H, $H-4$), 7.33 (d, $J = 2.7\text{ Hz}$, 1 H, $H-6$), 7.36-7.44 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.71-7.78 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 9.14 (bs, 1 H, OH), 10.48 (bs, 1 H, OH), 10.95 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 114.8, 118.1, 118.3, 121.4, 122.3, 127.8, 128.9, 137.6, 149.9, 150.6, 166.1. Elementární analýza (%) pro $C_{13}H_{10}ClNO_3$, Vypočteno: C, 59.22; H, 3.82; N, 5.31. Nalezeno: C, 59.15; H, 3.94; N, 5.38.

2,5-Dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (3d).

ir (KBr): (C=O) 1636 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 2.27 (s, 3 H, CH_3), 6.80 (d, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1 H, $H-3$), 6.87 (dd, $J = 3.0\text{ Hz}$, $J = 8.7\text{ Hz}$, 1 H, $H-4$), 7.12-7.17 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.36 (d, $J = 3.0\text{ Hz}$, 1 H, $H-6$), 7.54-7.59 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 9.10 (bs, 1 H, OH), 10.32 (bs, 1 H, OH), 11.10 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 20.7, 114.7, 118.0, 118.1,

120.9, 121.3, 129.4, 133.3, 136.0, 149.9, 150.9, 166.0. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_{13}NO_3$, Vypočteno: C, 69.12; H, 5.39; N, 5.76. Nalezeno: C, 69.01; H, 5.66; N, 5.87.

2,5-Dihydroxy-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (3f).

ir (KBr): (C=O) 1637 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 3.75 (s, 3 H, OCH_3), 6.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-3$), 6.89 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-4$), 6.91-6.96 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.38 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.56-7.62 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 9.09 (bs, 1 H, OH), 10.28 (bs, 1 H, OH), 11.19 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 55.4, 114.1, 114.5, 117.7, 118.0, 121.3, 122.7, 131.5, 149.8, 151.2, 156.1, 166.1. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_{13}NO_4$, Vypočteno: C, 64.86; H, 5.05; N, 5.40. Nalezeno: C, 64.95; H, 5.18; N, 5.38.

***N*-(4-Ethylfenyl)-2,5-dihydroxybenzamid (3g).**

ir (KBr): (C=O) 1654 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 1.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, CH_3), 2.54 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 6.79 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-3$), 6.85 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.09-7.14 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.33 (d, $J = 3.0$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.49-7.55 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 9.22 (bs, 1 H, OH), 10.26 (bs, 1 H, OH), 10.89 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 15.1, 28.2, 114.4, 117.9, 118.0, 121.0, 121.0, 129.2, 132.8, 135.3, 149.8, 151.1, 166.1. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{15}NO_3$, Vypočteno: C, 70.02; H, 5.88; N, 5.44. Nalezeno: C, 70.10; H, 5.99; N, 5.28.

***N*-Fenyl-2,6-dihydroxybenzamid (4a).**

ir (KBr): (C=O) 1654 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 6.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-3$, $H-5$), 7.10-7.15 (m, 1 H, $H-4$), 7.19 (t, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.32-7.38 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.61-7.65 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.73 (bs, 1 H, NH), 12.24 (bs, 2 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 104.3, 107.6, 121.2, 124.7, 129.2, 133.8, 133.7, 159.8, 168.3. Elementární analýza (%) pro $C_{13}H_{11}NO_3$, Vypočteno: C, 68.11; H, 4.84; N, 6.11. Nalezeno: C, 68.22; H, 4.96; N, 6.16.

***N*-(4-Chlorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (4b).**

ir (KBr): (C=O) 1648 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 6.42 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-3$, $H-5$), 7.19 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.39-7.45 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.66-7.72 (m, 2 H, $H-2'$,

H-6'), 10.74 (bs, 1 H, *NH*), 11.97 (bs, 2 H, *OH*); ^{13}C NMR (DMSO): δ 105.1, 107.5, 122.6, 128.2, 129.0, 133.7, 136.8, 159.5, 168.1. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$, Vypočteno: C, 59.22; H, 3.82; N, 5.31. Nalezeno: C, 59.40; H, 3.89; N, 5.41.

***N*-(4-Fluorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (4c).**

ir (KBr): (C=O) 1649 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 6.44 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 2 H, *H*-3, *H*-5), 7.18-7.25 (m, 3 H, *H*-4, *H*-3', *H*-5'), 7.66-7.72 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.71 (bs, 1 H, *NH*), 12.17 (bs, 2 H, *OH*); ^{13}C NMR (DMSO): δ 104.5, 107.6, 115.7 (d, $J = 88.8\text{ Hz}$), 123.3 (d, $J = 31.8\text{ Hz}$), 133.9 (d, $J = 96.9\text{ Hz}$), 157.4, 159.8, 160.6, 168.2. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{FNO}_3$, Vypočteno: C, 63.16; H, 4.08; N, 5.67. Nalezeno: C, 63.20; H, 3.90; N, 5.61.

2,6-Dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (4d).

ir (KBr): (C=O) 1651 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 2.28 (s, 3 H, CH_3), 6.43 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 1 H, *H*-3, *H*-5), 7.16-7.22 (m, 3 H, *H*-3', *H*-4, *H*-5'), 7.50-56 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.69 (bs, 1 H, *NH*), 12.34 (bs, 2 H, *OH*); ^{13}C NMR (DMSO): δ 20.7, 104.1, 107.6, 121.2, 129.5, 133.8, 133.9, 135.1, 159.9, 168.3. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_3$, Vypočteno: C, 69.12; H, 5.39; N, 5.76. Nalezeno: C, 89.88; H, 5.51; N, 5.81.

2,6-Dihydroxy-*N*-(3-methylfenyl)benzamid (4e).

ir (KBr): (C=O) 1646 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 2.32 (s, 3 H, CH_3), 6.44 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 1 H, *H*-3, *H*-5), 6.98 (dd, $J = 0.6\text{ Hz}$, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1 H, *H*-4'), 7.22 (t, $J = 8.1\text{ Hz}$, 1 H, *H*-4), 7.26 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1 H, *H*-5'), 7.43-7.54 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.72 (bs, 1 H, *NH*), 12.31 (bs, 2 H, *OH*); ^{13}C NMR (DMSO): δ 21.3, 104.1, 107.6, 118.3, 121.6, 125.4, 129.0, 133.8, 137.6, 138.5, 159.9, 168.4. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_3$, Vypočteno: C, 69.12; H, 5.39; N, 5.76. Nalezeno: C, 69.26; H, 5.51; N, 5.89.

2,6-Dihydroxy-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (4f).

ir (KBr): (C=O) 1652 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 3.75 (s, 3 H, OCH_3), 6.42 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 1 H, *H*-3, *H*-5), 6.90-6.97 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.20 (t, $J = 8.1\text{ Hz}$, 1 H, *H*-4), 7.52-7.58 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.63 (bs, 1 H, *NH*), 12.40 (bs, 2 H, *OH*); ^{13}C NMR

(DMSO): δ 55.4, 103.8, 107.6, 114.2, 122.9, 130.5, 133.8, 156.4, 160.0, 168.1. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_{13}NO_4$, Vypočteno: C, 64.86; H, 5.05; N, 5.40. Nalezeno: C, 64.96; H, 5.26; N, 5.50.

***N*-(4-Butylfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (4i).**

ir (KBr): (C=O) 1647 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 0.89 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, CH_3), 1.30 (sext, $J = 7.5$ Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.54 (pent, $J = 7.5$ Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2.55 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 6.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, $H-3, H-5$), 7.17-7.24 (m, 3 H, $H-4, H-3', H-5'$), 7.53-57 (m, 2 H, $H-2', H-6'$), 10.72 (bs, 1 H, NH), 12.40 (bs, 2 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 14.0, 21.9, 33.4, 34.5, 104.0, 107.6, 121.2, 128.9, 133.8, 135.3, 138.8, 160.0, 168.3. Elementární analýza (%) pro $C_{17}H_{19}NO_3$, Vypočteno: C, 71.56; H, 6.71; N, 4.91. Nalezeno: C, 71.41; H, 6.65; N, 5.06.

***N*-Benzyl-2,6-dihydroxybenzamid (4k).**

ir (KBr): (C=O) 1642 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 4.54-4.58 (m, 2H, CH_2), 6.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, $H-3, H-5$), 7.20 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.22-7.29 (m, 1 H, $H-4'$), 7.32-7.35 (m, 4 H, $H-2', H-3', H-5', H-6'$), 9.34 (bs, 1 H, NH), 12.55 (bs, 2 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 42.5, 102.7, 107.4, 127.2, 127.5, 128.7, 133.7, 139.0, 160.4, 170.2. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_{13}NO_3$, Vypočteno: C, 69.12; H, 5.39; N, 5.76. Nalezeno: C, 69.19; H, 5.46; N, 5.70.

2-Hydroxy-3-methoxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (5d).

ir (KBr): (C=O) 1644 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 2.28 (s, 3 H, CH_3), 3.82 (s, 3 H, OCH_3), 6.89 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-5$), 7.13-7.19 (m, 2 H, $H-3, H-6$), 7.55-7.59 (m, 4 H, $H-2', H-3', H-5', H-6'$), 10.31 (bs, 1 H, NH), 11.78 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 20.7, 56.1, 115.6, 117.2, 118.5, 119.9, 121.5, 129.3, 129.3, 133.6, 135.6, 148.6, 149.6, 167.5. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{15}NO_3$, Vypočteno: C, 70.02; H, 5.88; N, 5.44. Nalezeno: C, 70.19; H, 5.96; N, 5.22.

2-Hydroxy-6-methoxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (6d).

ir (KBr): (C=O) 1641 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 2.28 (s, 3 H, CH_3), 3.84 (s, 3 H, OCH_3), 6.55 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-5$), 6.55 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-3$), 7.12-7.16 (m, 2

H, *H*-3', *H*-5'), 7.25 (t, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-4), 7.58-7.61 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.15 (bs, 1 H, *NH*), 11.16 (bs, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 20.7, 56.2, 102.2, 109.6, 111.3, 120.2, 129.2, 131.7, 132.8, 136.5, 157.8, 158.6, 165.6. Elementární analýza (%) pro C₁₅H₁₅NO₃, Vypočteno: C, 70.02; H, 5.88; N, 5.44. Nalezeno: C, 70.10; H, 5.70; N, 5.60.

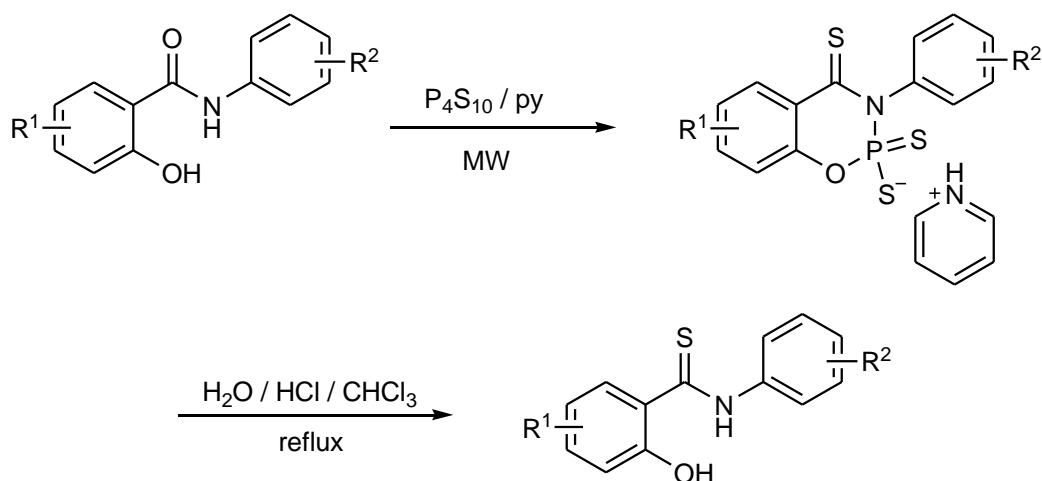
***N*-(4-Chlorfenyl)-2,3,4-trihydroxybenzamid (7b).**

ir (KBr): (C=O) 1647 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 6.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-5), 7.19-7.24 (m, 3 H, *H*-6, *H*-3', *H*-5'), 7.65-7.69 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 8.62 (bs, 1 H, *OH*), 9.76 (bs, 1 H, *OH*), 10.12 (bs, 1 H, *NH*), 12.16 (bs, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 107.3, 107.8, 119.2, 123.1, 128.0, 128.8, 133.1, 137.4, 150.6, 150.8, 168.7. Elementární analýza (%) pro C₁₃H₁₀ClNO₄, Vypočteno: C, 55.83; H, 3.60; N, 5.01. Nalezeno: C, 56.02; H, 3.66; N, 4.95.

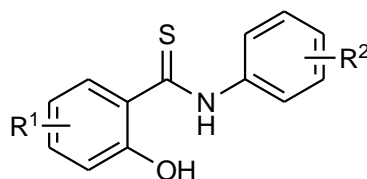
2,3,4-Trihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (7d).

ir (KBr): (C=O) 1645 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 2.28 (s, 3 H, CH₃), 6.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-5), 7.14-7.18 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-6), 7.52-7.55 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 8.60 (bs, 1 H, *OH*), 9.65 (bs, 1 H, *OH*), 10.07 (bs, 1 H, *NH*), 12.41 (bs, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 20.7, 107.1, 107.7, 118.9, 121.7, 129.3, 133.0, 133.4, 135.7, 150.4, 151.0, 168.6. Elementární analýza (%) pro C₁₄H₁₃NO₄, Vypočteno: C, 64.86; H, 5.05; N, 5.40. Nalezeno: C, 64.75; H, 5.21; N, 5.60.

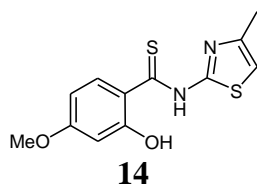
4.2 Příprava *N*-fenyl-dihydroxythiobezamidů



Směs odpovídajícího *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů (3 mmol), P_4S_{10} (3 mmol) a pyridinu (7 ml) byla po dobu 45-60 minut (3-4x 15 minut) zahřívána v mikrovlnném reaktoru při výkonu 500 W. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC za použití mobilní fáze aceton:hexan (2:3) do vymizení výchozí látky. Reakční směs byla poté ochlazena a nalita do 100 ml vody a 100 ml $CHCl_3$ a okyselena konc. HCl na pH ~ 1-2 a zahřívána na olejové lázni po dobu 3-6 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC za použití mobilní fáze aceton:hexan (2:3). Reakční směs byla ochlazena, organická fáze oddělena a odpařena do sucha. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze aceton:hexan (1:12) a rekrystalizován ze směsi ethanol-voda. Byla získána žlutá krystalická látka. Přehled připravených derivátů viz Tabulka č. 2.



	R¹		R²		R²
8	3-OH	a	H	g	4-CH₂CH₃
9	4-OH	b	4-Cl	h	4-C(CH₃)₂
10	5-OH	c	4-F	i	4-[CH₂]₃CH₃
11	6-OH	d	4-CH₃	j	4-CH₂CH(CH₃)₂
12	3-OCH₃	e	3-CH₃	k	4-CH₂C₆H₅*
13	6-OCH₃	f	4-OCH₃		

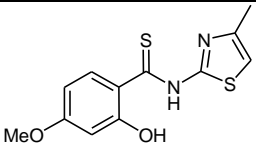


* Substituent na *N* místo fenylu

Tabulka č. 2: Přehled připravených *N*-fenyl-dihydroxyhiobenzamidů

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
8a	3-OH	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂ S 245.30	147-148	40
8b	3-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₂ S 279.75	155.5-7	39
8c	3-OH	4-F	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₂ S 263.29	131-132	42
8d	3-OH	4-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂ S 259.33	157-58.5	51
8g	3-OH	4-CH ₂ CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂ S 273.36	125-127	58
8j	3-OH	4-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂ S 301.41	90-91	62
9b	4-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₂ S 279.75	175-177 (177-8 ¹⁸⁶)	51
9d	4-OH	4-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂ S 259.33	163-164 (180 ¹⁸⁷)	44
9h	4-OH	4-C(CH ₃) ₂	C ₁₆ H ₁₇ NO ₂ S 287.37	167-168	51
10a	5-OH	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂ S 245.30	167-169	49
10b	5-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₂ S 279.75	172-174	53
10g	5-OH	4-CH ₂ CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂ S 273.36	117-119	42
11a	6-OH	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂ S 245.30	162-164	46

Tabulka č. 2: pokračování

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
11b	6-OH	4-Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₂ S 279.75	188-190	47
11e	6-OH	3-CH ₃	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂ S 259.33	147-149	59
11i	6-OH	4-[CH ₂] ₃ CH ₃	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂ S 301.41	127-128	53
11k	6-OH	4-CH ₂ C ₆ H ₅ *	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂ S 259.32	150-152	68
12d	3-OCH ₃	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂ S 273.35	162-164	54
13d	6-OCH ₃	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂ S 273.35	85-86	61
14			C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ 280.37	234-236	64

* Substituent na *N* místo fenylu***N*-Fenyl-2,3-dihydroxythiobenzamid (8a).**

ir (KBr): (O-H) 3495, (C-O) 1202, (C=S) 1080 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃COCD₃): δ 6.81 (t, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-5), 7.01 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-4), 7.31-7.37 (m, 2 H, *H*-4', *H*-6), 7.45-7.50 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.72-7.75 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 11.03 (bs, 2 H, OH); ¹³C NMR (CD₃COCD₃): δ 118.3, 118.7, 119.6, 125.3, 126.1, 127.8, 129.5, 139.8, 146.9, 147.5, 195.7. Elementární analýza (%) pro C₁₃H₁₁NO₂S, Vypočteno: C, 63.65; H, 4.52; N, 5.71; S, 13.07. Nalezeno: C, 63.51; H, 4.60; N, 5.68; S, 13.21.

***N*-(4-Chlorfenyl)-2,3-dihydroxythiobenzamid (8b).**

ir (KBr): (O-H) 3448, (C-O) 1204, (C=S) 1078 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃COCD₃): δ 6.80 (t, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-5), 7.01 (dd, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-4), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1

H, *H*-6), 7.48-7.52 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.77-7.81 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 8.05 (bs, 1 H, *OH*), 10.85 (bs, 1 H, *OH*), 11.07 (bs, 1 H, *NH*); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 118.7, 118.8, 125.9, 127.7, 129.6, 132.5, 138.7, 146.6, 147.4, 196.1. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 55.82; H, 3.60; N, 5.01; S, 11.46. Nalezeno: C, 55.85; H, 3.51; N, 4.93; S, 11.31.

***N*-(4-Fluorfenyl)-2,3-dihydroxythiobenzamid (8c).**

ir (KBr): (O-H) 3294, (C-O) 1215, (C=S) 1081 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 6.81 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, *H*-5), 7.01 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, *H*-4), 7.18-7.38 (m, 3 H, *H*-3', *H*-5', *H*-6), 7.71-7.78 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.79 (bs, 1 H, *OH*), 11.03 (bs, 1 H, *NH*); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 116.2 (d, $J = 22.9$ Hz), 118.8, 119.7 (d, $J = 15.7$ Hz), 122.8, 125.1, 128.4 (d, $J = 8.3$ Hz), 136.0, 146.9, 147.5, 161.9 (d, $J = 244.8$ Hz), 196.2. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{FNO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 59.30; H, 3.83; N, 5.32; S, 12.18. Nalezeno: C, 59.16; H, 3.79; N, 5.26; S, 12.15.

2,3-Dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)thiobenzamid (4d).

ir (KBr): (O-H) 3458, (C-O) 1201, (C=S) 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 2.37 (s, 3 H, CH_3), 6.80 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, *H*-5), 7.00 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, *H*-4), 7.25-7.32 (m, 3 H, *H*-3', *H*-5', *H*-6), 7.57-7.61 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.95 (bs, 2 H, *OH*); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 21.0, 118.0, 118.6, 119.5, 125.0, 125.9, 129.9, 137.1, 137.6, 146.9, 147.5, 195.3. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 64.84; H, 5.05; N, 5.40; S, 12.36. Nalezeno: C, 64.95; H, 5.07; N, 5.31; S, 12.33.

***N*-(4-Ethylfenyl)-2,3-dihydroxythiobenzamid (8g).**

ir (KBr): (O-H) 3499, (C-O) 1200, (C=S) 1081 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 1.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, CH_3), 2.68 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 6.80 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, *H*-5), 7.00 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, *H*-4), 7.26-7.37 (m, 3 H, *H*-3', *H*-5', *H*-6), 7.59-7.67 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.98 (bs, 1 H, *OH*), 10.93 (bs, 1 H, *NH*), 11.18 (bs, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 15.9, 29.0, 118.2, 118.7, 119.6, 125.3, 126.0, 128.7, 128.9, 137.4, 144.0, 147.6, 195.3. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 65.91; H, 5.53; N, 5.12; S, 11.73. Nalezeno: C, 66.12; H, 5.40; N, 4.96; S, 11.56.

***N*-(4-*sek*-Butylfenyl)-2,3-dihydroxythiobenzamid (8j).**

ir (KBr): (O-H) 3478, (C-O) 1202, (C=S) 1077 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 0.83 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.25 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CHCH_3), 1.63 (quin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2), 2.69 (sext, $J = 7.2$ Hz, 1 H, CH), 6.80 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, *H*-5), 7.00 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, *H*-4), 7.25-7.36 (m, 3 H, *H*-3', *H*-5', *H*-6), 7.63-7.71 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.97 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 12.5, 22.1, 29.0, 31.7, 42.1, 118.3, 118.7, 119.6, 125.3, 125.8, 128.0, 137.6, 146.9, 147.3, 147.6, 195.2. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 67.74; H, 6.35; N 4.65; S, 10.64. Nalezeno: C, 67.51; H, 6.49; N 4.49; S, 10.63.

***N*-(4-Chlorfenyl)-2,4-dihydroxythiobenzamid (9b).**

ir (KBr): (O-H) 3303, (C-O) 1224, (C=S) 1090 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 6.43-6.47 (m, 2 H, *H*-3, *H*-5), 7.45-7.50 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.67-7.71 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.84 (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H, *H*-6), 9.19 (bs, 1 H, OH), 10.87 (bs, 1 H, OH), 11.73 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 104.7, 108.4, 116.9, 128.1, 129.5, 130.2, 132.2, 138.8, 161.8, 163.2, 195.1. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 55.82; H, 3.60; N, 5.01; S, 11.46. Nalezeno: C, 55.75; H, 3.49; N, 4.95; S, 11.39.

2,4-Dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)thiobenzamid (9d).

ir (KBr): (O-H) 3333, (C-O) 1206, (C=S) 1110 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 2.35 (s, 3 H, CH_3), 6.40-6.46 (m, 2 H, *H*-3, *H*-5), 7.22-7.26 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.47-7.51 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.79 (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H, *H*-6), 9.13 (bs, 1 H, OH), 10.73 (bs, 1 H, OH), 11.85 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 21.0, 104.8, 108.2, 116.8, 126.3, 129.6, 129.9, 137.3, 137.4, 162.0, 162.9, 194.5. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 64.84; H, 5.05; N, 5.40; S, 12.36. Nalezeno: C, 64.98; H, 5.01; N, 5.24; S, 12.24.

2,4-Dihydroxy-*N*-(4-isopropylfenyl)thiobenzamid (9h).

ir (KBr): (O-H) 3304, (C-O) 1225, (C=S) 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 1.26 (d, $J = 6.9$ Hz, 6 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.95 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1 H, CH), 6.41-6.46 (m, 2 H, *H*-3, *H*-5), 7.29-7.34 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.53-7.57 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.80 (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H, *H*-6), 9.15 (bs, 1 H, OH), 10.74 (bs, 1 H, NH), 11.87 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 24.2, 34.4, 104.8, 108.2, 116.9, 126.3, 127.3, 129.7, 137.7, 148.2,

162.0, 163.0, 194.4. Elementární analýza (%) pro $C_{16}H_{17}NO_2S$, Vypočteno: C, 66.87; H, 5.96; N, 4.87; S, 11.16. Nalezeno: C, 66.75; H, 6.19; N, 4.75; S, 11.01.

***N*-Fenyl-2,5-dihydroxythiobenzamid (10a).**

ir (KBr): (O-H) 3265, (C-O) 1199, (C=S) 1076 cm^{-1} ; 1H NMR (CD_3COCD_3): δ 6.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, *H*-3), 6.99 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, *H*-4), 7.17-7.33 (m, 3 H, *H*-3', *H*-4', *H*-5'), 7.41 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H, *H*-6), 7.63-7.67 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.68 (bs, 1 H, *OH*), 10.31 (bs, 1 H, *NH*), 11.07 (bs, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (DMSO): δ 114.6, 119.2, 121.1, 122.1, 125.6, 130.0, 134.7, 137.6, 150.2, 150.9, 195.3. Elementární analýza (%) pro $C_{13}H_{11}NO_2S$, Vypočteno: C, 63.65; H, 4.52; N, 5.71; S, 13.07. Nalezeno: C, 63.51; H, 4.60; N, 5.68; S, 13.21.

***N*-(4-Chlorfenyl)-2,5-dihydroxythiobenzamid (10b).**

ir (KBr): (O-H) 3266, (C-O) 1266, (C=S) 1091 cm^{-1} ; 1H NMR (CD_3COCD_3): δ 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, *H*-3), 6.92 (dd, $J = 2.9$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, *H*-4), 7.37 (d, $J = 2.9$ Hz, 1 H, *H*-6), 7.46-7.51 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.82-7.86 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 11.19 (bs, 2 H, *OH*); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 115.3, 119.4, 121.3, 126.2, 127.2, 129.5, 132.1, 139.0, 150.4, 150.7, 195.9. Elementární analýza (%) pro $C_{13}H_{10}ClNO_2S$, Vypočteno: C, 55.82; H, 3.60; N, 5.01; S, 11.46. Nalezeno: C, 55.76; H, 3.44; N, 4.96; S, 11.54.

***N*-(4-Ethylfenyl)-2,5-dihydroxythiobenzamid (10g).**

ir (KBr): (O-H) 3237, (C-O) 1250, 1206, (C=S) 1079 cm^{-1} ; 1H NMR (CD_3COCD_3): δ 1.24 (t, $J = 7.8$ Hz, 3 H, *CH*₃), 2.68 (q, $J = 7.8$ Hz, 2 H, *CH*₂), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, *H*-3), 6.93 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, *H*-4), 7.28-7.35 (m, 3 H, *H*-3', *H*-5', *H*-6), 7.66-7.70 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.31 (bs, 1 H, *NH*), 11.08 (bs, 1 H, *OH*), 11.46 (bs, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 16.0, 30.7, 114.7, 119.6, 121.1, 122.1, 122.8, 126.0, 128.8, 137.8, 143.8, 150.6, 195.2. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{15}NO_2S$, Vypočteno: C, 65.91; H, 5.53; N, 5.12; S, 11.73. Nalezeno: C, 65.98; H, 5.71; N, 5.02; S, 11.56.

***N*-Fenyl-2,6-dihydroxythiobenzamid (11a).**

ir (KBr): (O-H) 3174, (C-O) 1258, (C=S) 1016 cm^{-1} ; 1H NMR (CD_3COCD_3): δ 6.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, *H*-3, *H*-5), 7.16 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, *H*-4), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, *H*-4),

7.47 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.79 (bs, 2 H, OH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 109.2, 114.3, 125.8, 127.8, 129.5, 133.0, 139.7, 157.6, 192.9. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 63.65; H, 4.52; N, 5.71; S, 13.07. Nalezeno: C, 63.72; H, 4.63; N, 5.72; S, 12.91.

***N*-(4-Chlorfenyl)-2,6-dihydroxythiobenzamid (11b).**

ir (KBr): (O-H) 3347; 1462, (C-O) 1310, 1198, (C=S) 1013 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 6.51 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $H-3$, $H-5$), 7.16 (t, $J = 8.3$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.48-7.52 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.79-7.83 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.46 (bs, 2 H, OH), 11.50 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 109.2, 114.6, 127.4, 129.6, 132.4, 133.2, 138.5, 157.5, 193.4. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 55.82; H, 3.60; N, 5.01; S, 11.46. Nalezeno: C, 55.95; H, 3.51; N, 4.89; S, 11.39.

2,6-Dihydroxy-*N*-(3-methylfenyl)thiobenzamid (11e).

ir (KBr): (O-H) 3321; 1461, (C-O) 1208, (C=S) 1084 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 2.37 (s, 3 H, CH_3), 6.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, $H-3$, $H-5$), 7.12-7.18 (m, 2 H, $H-4'$, $H-5'$), 7.34 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.53-7.61 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.30 (bs, 2 H, OH), 11.22 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 21.3, 109.2, 122.9, 126.2, 128.5, 129.4, 133.0, 139.4, 139.6, 157.7, 192.8. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 64.84; H, 5.05; N, 5.40; S, 12.36. Nalezeno: C, 64.71; H, 5.16; N, 5.29; S, 12.26.

***N*-(4-Butylfenyl)-2,6-dihydroxythiobenzamid (11i).**

ir (KBr): (O-H) 3172; 1452, (C-O) 1291, 1203, (C=S) 1015 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_3), 1.37 (sext, $J = 7.2$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.63 (quin, $J = 7.8$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.65 (t, $J = 7.8$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, $H-3$, $H-5$), 7.15 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.27-7.31 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.65-7.69 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.64 (bs, 2 H, OH), 11.31 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 14.1, 22.9, 34.3, 35.7, 109.2, 114.2, 125.5, 129.4, 133.0, 137.3, 142.6, 157.6, 192.4. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 67.74; H, 6.35; N 4.65; S, 10.64. Nalezeno: C, 67.84; H, 6.39; N 4.49; S, 10.53.

N-Benzyl-2,6-dihydroxythiobenzamid (11k).

ir (KBr): (O-H) 3224; 1460, (C-O) 1204, (C=S) 1031 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 5.03-5.05 (m, 2 H, CH_2), 6.48 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, $H-3$, $H-5$), 7.12 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.26-7.38 (m, 3 H, $H-3'$, $H-4'$, $H-5'$), 7.45-7.47 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.59 (bs, 1 H, NH), 10.91 (bs, 2 H, OH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 49.5, 109.3, 112.2, 128.2, 128.7, 129.4, 133.1, 137.5, 158.1, 192.7. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 64.84; H, 5.05; N, 5.40; S, 12.36. Nalezeno: C, 64.97; H, 4.89; N 5.49; S, 12.50.

2-Hydroxy-3-methoxy-N-(4-methylfenyl)thiobenzamid (12d).

ir (KBr): (O-H) 3251, (C-O) 1249, (C=S) 1083 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 2.35 (s, 3 H, CH_3), 3.88 (s, 3 H, OCH_3), 6.87 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-5$), 7.85 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.23-7.27 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.53 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.72-7.80 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 9.78 (bs, 1 H, NH), 11.06 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 21.0, 56.6, 114.6, 119.4, 122.5, 125.0, 127.5, 129.9, 137.0, 137.9, 145.9, 149.2, 195.2. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 65.91; H, 5.53; N, 5.12; S, 11.73. Nalezeno: C, 65.80; H, 5.69; N, 5.07; S, 11.66.

2-Hydroxy-6-methoxy-N-(4-methylfenyl)thiobenzamid (13d).

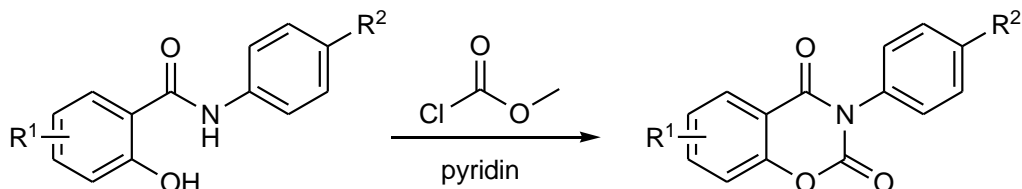
ir (KBr): (O-H) 3284, (C-O) 1234, (C=S) 1076 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 2.36 (s, 3 H, CH_3), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 6.56-6.63 (m, 2 H, $H-3$, $H-5$), 7.24 (t, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.26-7.30 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.72-7.79 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.10 (bs, 1 H, NH), 11.23 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 21.1, 56.5, 103.2, 111.3, 117.7, 123.6, 125.0, 129.9, 132.2, 137.4, 156.6, 158.4, 192.2. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$, Vypočteno: C, 65.91; H, 5.53; N, 5.12; S, 11.73. Nalezeno: C, 65.85; H, 5.50; N, 5.08; S, 11.80.

2-Hydroxy-4-methoxy-N-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)thiobenzamid (14)

ir (KBr): (O-H) 3310, (C-O) 1229, (C=S) 1092 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3): δ 2.42 (s, 3 H, CH_3), 3.81 (s, 3 H, OCH_3), 6.32 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H, $H-3$), 6.44 (dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 1 H, $H-5$), 6.69 (d, $J = 1.2$ Hz, 1 H, CH-thiazol), 8.45 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, $H-6$); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 13.6, 55.6, 101.5, 105.9, 107.3, 120.6, 135.4, 136.4, 161.5,

164.7, 168.9, 200.3. Elementární analýza (%) pro $C_{12}H_{12}N_2O_2S_2$, Vypočteno: C, 51.41; H, 4.31; N 9.99; S, 22.87. Nalezeno: C, 51.35; H, 4.21; N 9.91; S, 22.83.

4.3 Příprava hydroxyderivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu



Směs příslušného *N*-fenyl-dihydroxybenzamidu (5 mmol) v 50 ml pyridinu byla ochlazena ve směsi voda-led-NaCl na -5 až 0 °C. Za stálého míchání byl přikapáván methyl-chlorfomiát (0.5 ml, 6 mmol) tak, aby teplota směsi nepřekročila +5 °C. Směs byla 2 hodiny zahřívána na olejové lázni a následně 12 hodin za laboratorní teploty. Směs byla poté okyselena 5% HCl na pH \approx 6, přičemž vznikl bílý zákal. Výsledná heterogenní směs byla ochlazena za vzniku bílých krystalů. Surový produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku a překrystalován z ethanolu. Přehled připravených derivátů viz Tabulka č. 3.

Tabulka č. 3: Přehled připravených hydroxyderivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
15a	8-OH	H	C ₁₄ H ₉ NO ₄ 255.23	276-278.5	88
15b	8-OH	4-Cl	C ₁₄ H ₈ ClNO ₄ 289.68	255-257	90
15d	8-OH	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄ 269.26	243-245	91
15f	8-OH	4-OCH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅ 285.26	245-247	89
16a	7-OH	H	C ₁₄ H ₉ NO ₄ 255.23	283-286	81

Tabulka č. 3: pokračování

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
16b	7-OH	4-Cl	C ₁₄ H ₈ ClNO ₄ 289.68	250-252	77
16d	7-OH	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄ 269.26	282-285	86
16f	7-OH	4-OCH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅ 285.26	262-265	84
17a	6-OH	H	C ₁₄ H ₉ NO ₄ 255.23	266-269	89
17b	6-OH	4-Cl	C ₁₄ H ₈ ClNO ₄ 289.68	233-235	83
17d	6-OH	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄ 269.26	269-272	87
17f	6-OH	4-OCH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅ 285.26	275-278	90
18a	5-OH	H	C ₁₄ H ₉ NO ₄ 255.23	172-173 (169-70 ¹⁸⁸)	87
18b	5-OH	4-Cl	C ₁₄ H ₈ ClNO ₄ 289.68	232-234 (226-28 ¹⁸⁸)	93
18d	5-OH	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄ 269.26	179-181 (177-7,5 ¹⁸⁸)	89
18f	5-OH	4-OCH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅ 285.26	212-214	85
18i	5-OH	4-[CH ₂] ₃ CH ₃	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄ 311,34	158-159	93

3-Fenyl-8-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (15a).

ir (KBr): (C=O) 1676, 1785 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 7.24 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H*-6), 7.31 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H*-7), 7.40 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1 H, *H*-5), 7.42-7.54 (m, 5 H, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 10.54 (bs, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 116.1, 116.9, 122.2, 125.4, 128.8, 129.2, 135.6, 141.7, 145.2, 147.7, 161.1.

Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_9NO_4$, Vypočteno: C, 65.88; H, 3.55; N, 5.49. Nalezeno: C, 65.96; H, 3.77; N, 5.85.

3-(4-Chlorfenyl)-8-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (15b).

ir (KBr): (C=O) 1699, 1742 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 7.24 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.30 (dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-7$), 7.39 (dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $H-5$), 7.44-7.50 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.54-7.61 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.55 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 116.0, 116.9, 122.3, 125.4, 129.3, 130.8, 133.5, 134.5, 141.6, 145.2, 147.6, 161.1. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_8ClNO_4$, Vypočteno: C, 58.05; H, 2.78; N, 4.84. Nalezeno: C, 57.87; H, 2.91; N, 4.84.

8-Hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (15d).

ir (KBr): (C=O) 1701, 1753 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 2.37 (s, 3 H, CH_3), 7.23 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.25-7.34 (m, 5 H, $H-7$, $H-2'$, $H-3'$, $H-5'$, $H-6'$), 7.39 (dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $H-5$), 10.49 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 20.5, 115.5, 116.5, 121.8, 124.9, 128.0, 129.2, 132.4, 137.9, 141.2, 144.7, 147.3, 160.7. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{11}NO_4$, Vypočteno: C, 66.91; H, 4.12; N, 5.20. Nalezeno: C, 67.09; H, 4.22; N, 5.22.

8-Hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (15f).

ir (KBr): (C=O) 1704, 1766 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 3.81 (s, 3 H, OCH_3), 7.00-7.07 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.27-7.36 (m, 3 H, $H-7$, $H-2'$, $H-6'$), 7.39 (dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H-5$), 10.48 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 55.6, 114.4, 116.1, 116.9, 122.1, 125.3, 128.0, 129.9, 141.6, 145.2, 147.9, 159.4, 161.3. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{11}NO_5$, Vypočteno: C, 63.16; H, 3.89; N, 4.91. Nalezeno: C, 63.29; H, 4.11; N, 4.88.

3-Fenyl-7-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (16a).

ir (KBr): (C=O) 1699, 1770 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 6.74 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-8$), 6.86 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.38-7.52 (m, 5 H, $H-2'$, $H-3'$, $H-4'$, $H-5'$, $H-6'$), 7.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-5$), 11.08 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 101.9, 106.4, 114.1, 128.8, 128.9, 129.2, 129.5, 135.5, 148.1, 154.6, 160.4, 164.8. Elementární

analýza (%) pro $C_{14}H_9NO_4$, Vypočteno: C, 65.88; H, 3.55; N, 5.49. Nalezeno: C, 65.59; H, 3.62; N, 5.49.

3-(4-Chlorfenyl)-7-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (16b).

ir (KBr): (C=O) 1703, 1766 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 6.74 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-8$), 6.86 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.41-7.47 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.53-7.59 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-5$), 11.10 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 101.9, 106.3, 114.1, 129.2, 129.5, 130.9, 133.4, 134.4, 148.0, 154.6, 160.3, 164.9. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_8ClNO_4$, Vypočteno: C, 58.05; H, 2.78; N, 4.84. Nalezeno: C, 58.31; H, 2.86; N, 4.76.

7-Hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (16d).

ir (KBr): (C=O) 1698, 1771 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 2.37 (s, 3 H, CH_3), 6.73 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-8$), 6.85 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.23-7.31 (m, 4 H, $H-2'$, $H-3'$, $H-5'$, $H-6'$), 7.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-5$), 11.07 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 21.0, 101.8, 106.4, 114.0, 128.6, 129.5, 129.6, 132.8, 138.2, 148.3, 154.5, 160.4, 164.8. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{11}NO_4$, Vypočteno: C, 66.91; H, 4.12; N, 5.20. Nalezeno: C, 66.98; H, 4.29; N, 5.23.

7-Hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (16f).

ir (KBr): (C=O) 1704, 1766 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 3.80 (s, 3 H, OCH_3), 6.73 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-8$), 6.85 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-6$), 6.99-7.05 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.27-7.32 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-5$), 11.05 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 56.0, 102.3, 106.9, 114.5, 114.8, 128.5, 130.0, 130.4, 148.8, 155.0, 159.8, 161.0, 165.3. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{11}NO_5$, Vypočteno: C, 63.16; H, 3.89; N, 4.91. Nalezeno: C, 63.21; H, 3.97; N, 5.06.

3-Fenyl-6-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (17a).

ir (KBr): (C=O) 1735, 1680 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 7.24 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-7$), 7.28 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, $H-5$), 7.35 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-8$), 7.38-7.54 (m, 5 H, $H-2'$, $H-3'$, $H-4'$, $H-5'$, $H-6'$), 11.05 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 111.3, 115.4, 117.8, 124.2, 128.8, 129.2, 135.6, 145.8, 148.0, 154.7, 160.9. Elementární

analýza (%) pro $C_{14}H_9NO_4$, Vypočteno: C, 65.88; H, 3.55; N, 5.49. Nalezeno: C, 65.71; H, 3.82; N, 5.53.

3-(4-Chlorfenyl)-6-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (17b).

ir (KBr): (C=O) 1749, 1685 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 7.20-7.24 (m, 2 H, *H*-5, *H*-7), 7.34 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, *H*-8), 7.42-7.47 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.54-7.59 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.15 (bs, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (DMSO): δ 110.8, 114.8, 117.4, 123.9, 128.8, 130.3, 133.1, 133.9, 145.3, 147.3, 154.2, 160.3. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_8ClNO_4$, Vypočteno: C, 58.05; H, 2.78; N, 4.84. Nalezeno: C, 57.81; H, 2.75; N, 4.84.

6-Hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (17d).

ir (KBr): (C=O) 1749, 1683 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 2.37 (s, 3 H, CH_3), 7.23 (dd, J = 3.0 Hz, J = 8.7 Hz, 1 H, *H*-7), 7.26-7.35 (m, 6 H, *H*-5, *H*-8, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6'), 10.04 (bs, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (DMSO): δ 21.0, 111.3, 115.4, 117.8, 124.2, 128.5, 129.7, 132.9, 138.3, 145.8, 148.0, 154.7, 160.9. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{11}NO_4$, Vypočteno: C, 66.91; H, 4.12; N, 5.20. Nalezeno: C, 66.59; H, 4.24; N, 5.23.

6-Hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (17f).

ir (KBr): (C=O) 1751, 1704 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 3.81 (s, 3 H, OCH_3), 7.00-7.06 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.23 (dd, J = 2.7 Hz, J = 8.7 Hz, 1 H, *H*-7), 7.27 (d, J = 2.7 Hz, 1 H, *H*-5), 7.28-7.35 (m, 3 H, *H*-8, *H*-2', *H*-6'), 10.04 (bs, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (DMSO): δ 55.6, 111.3, 114.4, 115.4, 117.8, 124.2, 128.0, 129.8, 145.8, 148.2, 154.7, 159.4, 161.0. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{11}NO_5$, Vypočteno: C, 63.16; H, 3.89; N, 4.91. Nalezeno: C, 62.91; H, 3.98; N, 4.84.

3-Fenyl-5-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (18a).

ir (KBr): (C=O) 1761, 1662 cm^{-1} ; 1H NMR (250 MHz, DMSO): δ 6.88 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, *H*-6), 6.92 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, *H*-8), 7.44-7.57 (m, 5 H, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 7.69 (t, J = 8.3 Hz, 1 H, *H*-7), 10.78 (bs, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (250 MHz, DMSO): δ 100.9, 105.9, 112.0, 128.2, 128.7, 128.8, 133.9, 136.9, 146.7, 152.3, 159.1, 164.3.

Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_9NO_4$, Vypočteno: C, 65.88; H, 3.55; N, 5.49. Nalezeno: C, 65.95; H, 3.76; N, 5.63.

3-(4-Chlorfenyl)-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (18b).

ir (KBr): (C=O) 1757, 1666 cm^{-1} ; 1H NMR (250 MHz, DMSO): δ 6.84-6.95 (m, 2 H, *H*-6, *H*-8), 7.44-7.52 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.54-7.62 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.68 (t, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-7), 10.68 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (250 MHz, DMSO): δ 101.7, 106.7, 112.9, 129.6, 131.0, 133.5, 134.2, 137.7, 147.3, 153.0, 159.9, 164.9. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_8ClNO_4$, Vypočteno: C, 58.05; H, 2.78; N, 4.84. Nalezeno: C, 57.89; H, 3.09; N, 4.86.

5-Hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (18d).

ir (KBr): (C=O) 1752, 1667 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 2.38 (s, 3 H, CH_3), 6.88 (dd, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-6), 6.93 (dd, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-8), 7.29-7.35 (m, 4 H, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6'), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-7), 10.79 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 21.0, 101.5, 106.4, 112.5, 128.5, 129.8, 31.8, 137.4, 138.7, 147.3, 152.8, 159.7, 165.0. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{11}NO_4$, Vypočteno: C, 66.91; H, 4.12; N, 5.20. Nalezeno: C, 66.86; H, 4.29; N, 5.26.

5-Hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (18f).

ir (KBr): (C=O) 1765, 1679 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 3.81 (s, 3 H, OCH_3), 6.87 (dd, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.2 Hz, 1 H, *H*-6), 6.92 (dd, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.2 Hz, 1 H, *H*-8), 7.02-7.08 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.33-7.39 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.69 (t, *J* = 8.2 Hz, 1 H, *H*-7), 10.81 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 55.6, 101.5, 106.4, 112.4, 114.5, 126.8, 129.8, 137.4, 147.4, 152.8, 159.6, 159.7, 165.2. Elementární analýza (%) pro $C_{15}H_{11}NO_5$, Vypočteno: C, 63.16; H, 3.89; N, 4.91. Nalezeno: C, 63.20; H, 4.04; N, 5.07.

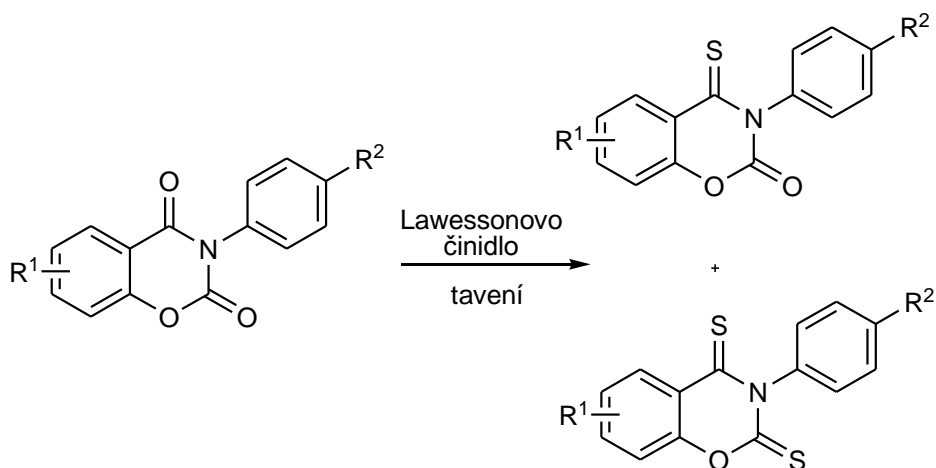
3-(4-Butylfenyl)-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (18i).

ir (KBr): (C=O) 1668, 1771 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 0.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 3 H, CH_3), 1.34 (sext, *J* = 7.5 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.60 (pent, *J* = 7.5 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2.64 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 6.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-6), 6.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-8), 7.27-7.39 (m, 4 H, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6'), 7.68 (t,

$J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-7$) 10.78 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 14.0, 22.0, 33.2, 34.7, 101.5, 106.4, 112.4, 128.5, 129.1, 132.0, 137.4, 143.4, 147.3, 152.8, 159.6, 165.0. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_4$, Vypočteno: C, 69.44; H, 5.50; N, 4.50. Nalezeno: C, 69.29; H, 5.64; N, 4.53.

4.4 Přírava hydroxyderivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu a jejich monosírných analogů

4.4.1 Příprava tavením s Lawessonovým činidlem



Do 10ml baňky byl předložen příslušný 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (4 mmol) a ekvimolární množství Lawessonova činidla (1.6 g, 4 mmol). Směs byla tavena 4 minuty na kovové lázni při teplotě 190-200 °C, poté rozpuštěna v chloroformu a následně 1 × vytřepána s 5% roztokem NaHCO_3 a 1 × s vodou. Chloroformová fáze byla odpařena a surová směs byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita směs hexan a toluen (1:1). Byly izolovány 2 produkty, a to disírný derivát s vyšší hodnotou R_f a monosírný derivát s nižší hodnotou R_f . Získané žluto-oranžové látky byly následně rekrystalovány z ethanolu. Přehled připravených derivátů viz Tabulka č. 4 a 5.



Tabulka č. 4: Přehled připravených hydroxyderivátů 3-fenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
19a	5-OH	H	C ₁₄ H ₉ NO ₃ S 271,30	178-179	42
19b	5-OH	4-Cl	C ₁₄ H ₈ ClNO ₃ S 305.74	223-225	39
19d	5-OH	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃ S 285.32	163-165	37
19f	5-OH	4-OH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄ S 301.32	185-187	31
20b	7-OH	4-Cl	C ₁₄ H ₈ ClNO ₃ S 305.74	258-261	5

3-Fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-on (19a).

ir (KBr): (C=O) 1759, (C=S) 1072 cm⁻¹; ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 6.79 (dd, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1 H, *H*-6), 6.95 (dd, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1 H, *H*-8), 7.23-7.28 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.52-7.63 (m, 4 H, *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-7), 12.86 (bs, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 106.1, 107.8, 115.2, 128.1, 129.7, 130.1, 137.0, 137.4, 144.5, 149.6, 161.8, 192.5. Elementární analýza (%) pro C₁₄H₉NO₃S, Vypočteno: C, 61.98; H, 3.34; N, 5.16; S, 11.82. Nalezeno: C, 62.02; H, 3.46; N, 5.09; S, 12.20.

3-(4-Chlorfenyl)-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-on (19b).

ir (KBr): (C=O) 1752, (C-O) 1253, (C=S) 1086 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 6.79 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1 H, *H*-6), 6.95 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1 H, *H*-8), 7.16-7.21 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.51-7.60 (m, 3 H, *H*-7, *H*-3', *H*-5'), 12.76 (bs, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 106.1, 107.7, 115.3, 129.6, 130.4, 135.7, 135.8, 137.2, 144.3, 149.5, 161.8, 192.2. Elementární analýza (%) pro C₁₄H₈ClNO₃S, Vypočteno: C, 55.00; H, 2.64; N, 4.58; S, 10.49. Nalezeno: C, 54.89; H, 2.74; N, 4.52; S, 10.68.

5-Hydroxy-3-(4-methylfenyl)-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-on (19d).

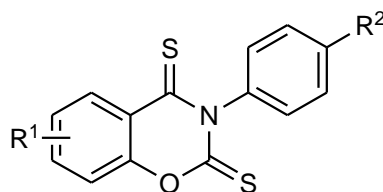
ir (KBr): (C=O) 1751, (C-O) 1210, (C=S) 1071 cm^{-1} ; ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 2.46 (s, 3 H, CH_3), 6.78 (dd, $J = 1.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-6$), 6.94 (dd, $J = 1.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-8$), 7.08-7.17 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.34-7.42 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.55 (t, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-7$), 12.89 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 21.4, 106.1, 107.8, 115.2, 127.7, 130.8, 134.8, 136.9, 139.9, 144.5, 149.6, 161.8, 192.6. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$, Vypočteno: C, 63.14; H, 3.89; N, 4.91; S, 11.24. Nalezeno: C, 63.05; H, 4.09; N, 4.65; S, 11.51.

5-Hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-on (19f).

ir (KBr): (C=O) 1766, (C-O) 1216, (C=S) 1073 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 6.78 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.5$ Hz, 1 H, $H-6$), 6.94 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.5$ Hz, 1 H, $H-8$), 7.02-7.09 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.12-7.19 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.55 (t, $J = 8.5$ Hz, 1 H, $H-7$), 12.90 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 55.5, 106.0, 107.8, 115.1, 115.3, 129.1, 129.8, 136.9, 144.7, 149.5, 160.2, 161.7, 192.8. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{S}$, Vypočteno: C, 63.77; H, 5.02; N, 4.65; S, 10.64. Nalezeno: C, 63.81; H, 5.12; N, 4.53; S, 10.89.

3-(4-Chlorfenyl)-7-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-on (20b).

ir (KBr): (C=O) 1733, (C-O) 1252, (C=S) 1089 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 6.72 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-8$), 6.93 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.43-7.47 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.53-7.57 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 8.27 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, $H-5$), 10.10 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 102.0, 115.4, 129.8, 130.1, 130.3, 131.4, 134.6, 139.8, 145.6, 152.6, 165.7, 192.6. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{ClNO}_3\text{S}$, Vypočteno: C, 55.00; H, 2.64; N, 4.58; S, 10.49. Nalezeno: C, 55.22; H, 2.74; N, 4.60; S, 10.40.



Tabulka č. 5: Přehled připravených 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů

Látka	R ¹	R ²	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
21a	5-OH	H	C ₁₄ H ₉ NO ₂ S ₂ 287.	192-193	32
21b	5-OH	4-Cl	C ₁₄ H ₈ ClNO ₂ S ₂ 321.8	166-167	27
21d	5-OH	4-CH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂ S ₂ 301.38	179-180	24
21f	5-OH	4-OH ₃	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃ S ₂ 317.38	150-152	33

3-Fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion (21a).

ir (KBr): (O-H_{fenol}) 1371, (C=S) 1171 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 6.85 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-6), 6.94 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-8), 7.19-7.23 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.49-7.62 (m, 4 H, *H*-7, *H*-3', *H*-4', *H*-5'), 12.74 (bs, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 105.7, 109.2, 115.4, 128.1, 129.4, 130.2, 137.5, 141.5, 149.9, 161.6, 177.0, 187.9. Elementární analýza (%) pro C₁₄H₉NO₂S₂, Vypočteno: C, 58.52; H, 3.16; N, 4.87; S, 22.32. Nalezeno: C, 58.66; H, 3.25; N, 4.65; S, 22.46.

3-(4-Chlorfenyl)-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion (21b).

ir (KBr): (C-O) 1260, (C=S) 1163, 1089 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 6.84 (dd, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-8), 6.95 (dd, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-6), 7.11-7.20 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.48-7.57 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.59 (t, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-7), 16.64 (s, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 105.8, 109.2, 115.6, 129.7, 130.6, 135.5, 137.6, 139.9, 149.9, 161.7, 176.8, 188.8. Elementární analýza (%) pro C₁₄H₈ClNO₂S₂, Vypočteno: C, 52.25; H, 2.51; N, 4.35; S, 19.93. Nalezeno: C, 52.16; H, 2.55; N, 4.35; S, 20.21.

5-Hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion (21d).

ir (KBr): (O-H) 3474, (CH₃) 1450, (C=S) 1169 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.46 (s, 3 H, CH₃), 6.84 (dd, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-8), 6.95 (dd, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1 H,

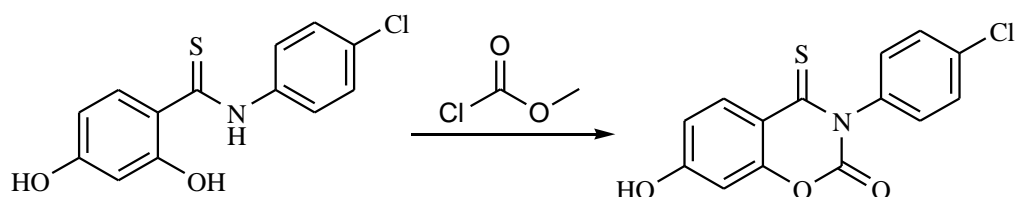
H-6), 7.06-7.11 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.35-7.40 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.58 (t, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-7), 12.76 (s, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 21.4, 105.7, 109.2, 115.4, 127.7, 130.9, 137.4, 139.0, 139.7, 149.9, 161.6, 177.2, 188.0. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}_2$, Vypočteno: C, 59.78; H, 3.68; N, 4.65; S, 21.28. Nalezeno: C, 59.81; H, 3.78; N, 4.55; S, 21.24.

5-Hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion (21f).

ir (KBr): (C-O) 1249, (C=S) 1161 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 3.88 (s, 3 H, *OCH*₃), 6.83 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-6), 6.94 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-8), 7.03-7.14 (m, 4 H, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6'), 7.58 (t, *J* = 8.3 Hz, 1 H, *H*-7), 12.78 (bs, 1 H, *OH*); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 55.4, 105.7, 109.2, 115.3, 115.4, 129.1, 134.2, 137.4, 149.9, 160.0, 161.5, 177.4, 188.2. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}_2$, Vypočteno: C, 56.77; H, 3.49; N, 4.41; S, 20.20. Nalezeno: C, 56.88; H, 3.57; N, 4.42; S, 20.51.

4.4.2 Příprava monosírných analogů cyklizačními reakcemi

4.4.2.1 3-(4-Chlorfenyl)-7-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-on (20b)

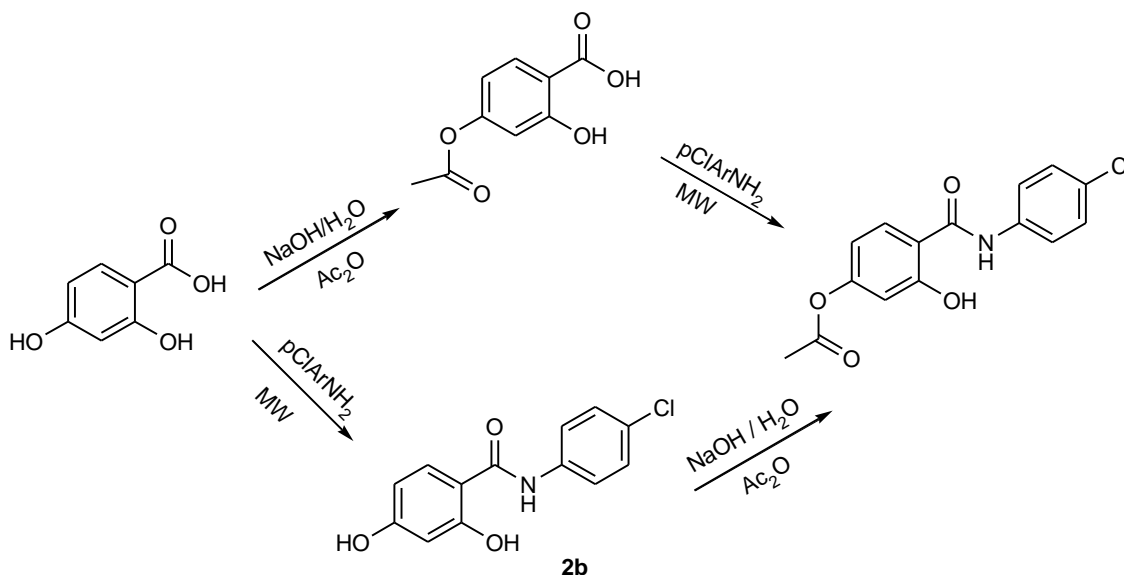


K přípravě byl použit analogický způsob jako v kapitole 5.3. Výchozí látkou byl thioamid **9b**. Touto metodou bylo docíleno 76% výtěžku. Látka je totožná s látkou **20b**, která byla připravena tavením s Lawessonovým činidlem v 5% výtěžku (viz kapitola 4.4.1).

4.4.2.2 Příprava 3-(4-chlorfenyl)-7-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-1,3-benzoxazin-4-onu (24)

Příprava látky **24** zahrnovala a) syntézu *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxybenzamid s chráněnou hydroxyskupinou v poloze 4 (dvěma způsoby), b) cyklizaci meziprojektu a c) deacetylaci v poloze 4.

a) **4-[(4-Chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetát (22)**



Do baňky byla předložena 2,4-dihydroxybenzoová kyselina (4.5 g, 29 mmol) a 45 ml 7,5% NaOH. Směs byla ohřata na 50-60 °C, bylo k ní přidáno 4.7 ml acetanhydridu. Reakční směs byla 5 minut míchána za laboratorní teploty a poté ochlazená ve směsi voda-led-NaCl. Ke směsi byla přidána 5% HCl, dokud pH roztoku nebylo neutrální. Surový produkt byl následně odfiltrován a promyt 3x vodou. Produkt byl překrystalován z toluenu. Bylo získáno 3.8 g 4-acetoxy-2-hydroxybenzoové kyseliny (68 % výtěžek), bílé krystalické látky, C₉H₈O₅ (196.16), t. t. 147-149 °C (lit.¹⁸⁹ 149-150 °C).

Přímá acetylace *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (**2b**) byla provedena analogickým způsobem. K reakci byl použit *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (**2b**) (1 g, 3.8 mmol) a 10 ml 7,5% NaOH a 0.5 ml acetanhydridu. Produkt byl čištěn rekrytalizací z ethanolu. Bylo získáno 0.85 g (74 %) 4-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetátu (**22**).

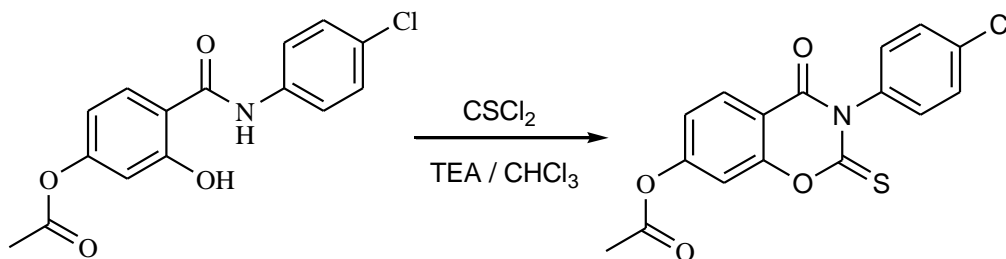
Do baňky byla předložena 4-acetoxy-2-hydroxybenzoová kyselina (1.5 g, 7.6 mmol), 4-chloranilin (1.45 g, 11.4 mmol) a 50 ml chlorbenzenu. Poté byl přidáno 0.4 ml

PCl_3 a směs byla zpracována v mikrovlnném reaktoru analogickým způsobem (viz kapitola 5.1). K čištění nebyla použita sloupcová chromatografie, ale produkt byl rekrystalován z ethanolu. Bylo získáno 1.2 g (51 %) 4-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetátu (**22**).

4-[(4-Chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetát (**22**)

$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClNO}_4$ (305.71); t. t. 197-199 °C; ir (KBr): (C=O) 1759, (C-O_{ester}) 1195 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 2.28 (s, 3 H, CH_3), 6.73-6.78 (m, 2 H, $H-3$, $H-5$), 7.40-7.44 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.73-7.77 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.95 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-6$), 10.42 (bs, 1 H, NH), 11.90 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 21.1, 110.5, 113.1, 115.9, 122.5, 128.0, 128.9, 130.4, 137.4, 154.4, 159.4, 166.1, 168.9. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClNO}_4$, Vypočteno: C, 58.93; H, 3.96; N, 4.58. Nalezeno: C, 59.10; H, 4.06; N, 4.53.

b) 3-(4-Chlorfenyl)-4-oxo-2-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-7-yl-acetát (**23**)

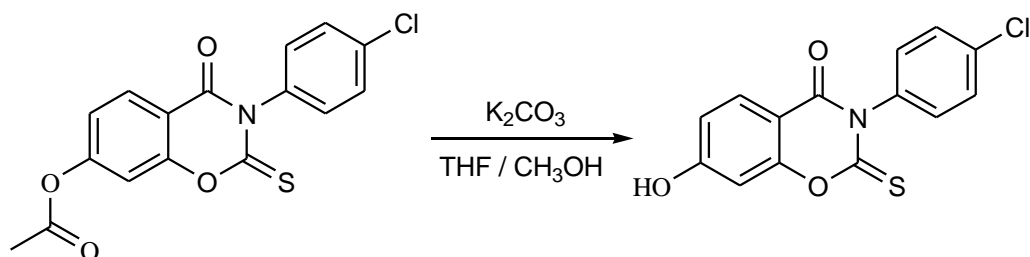


Do baňky bylo předloženo 0.5 g 4-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetátu (**22**) (1,6 mmol), 0.54 ml triethylaminu ($2.4 \times 1,6$ mmol) a 15 ml bezvodého chloroformu. Směs byla ochlazená a během 15 minut byla z dělicí nálevky přidána směs 0.15 ml thiofosgenu ($1.2 \times 1,6$ mmol) v 5 ml bezvodého chloroformu. Směs byla poté 15 minut zahřívána k varu a následně 12 hodin míchána za laboratorní teploty. Chloroformový roztok byl vytřepán 3 \times s vodou a po odpaření byla získána bílá krystalická látka. Surový produkt byl krystalován z ethanolu. Bylo získáno 0.35 g (62 %) 3-(4-chlorfenyl)-4-oxo-2-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-7-yl-acetátu (**23**).

3-(4-Chlorfenyl)-4-oxo-2-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-7-yl-acetát (23)

$C_{16}H_{10}ClNO_4S$ (347.77); t. t. 178-180 °C; ir (KBr): (C=O) 1768, 1709, (C-O_{ester}) 1167, (C=S) 1087 cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$): δ 2.37 (s, 3 H, CH_3), 7.16-2.26 (m, 4 H, $H-6$, $H-8$, $H-3'$, $H-5'$), 7.49-7.53 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 8.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-5$); ^{13}C NMR (DMSO): δ 21.1, 109.8, 112.6, 120.2, 129.4, 129.6, 130.2, 135.4, 136.4, 155.3, 156.8, 156.9, 168.0, 181.7. Elementární analýza (%) pro $C_{16}H_{10}ClNO_4S$, Vypočteno: C, 55.26; H, 2.90; N, 4.03; S, 9.22. Nalezeno: C, 55.09; H, 2.97; N, 4.12; S, 9.39.

c) **3-(4-Chlorfenyl)-7-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4H-1,3-benzoxazin-4-on (24)**

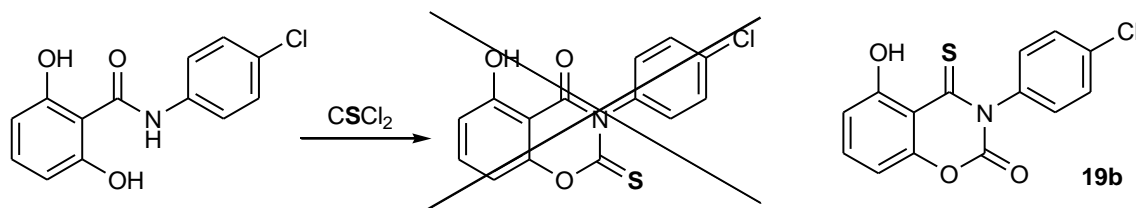


Do baňky bylo předloženo 0.1 g 3-(4-chlorfenyl)-4-oxo-2-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-7-yl-acetátu (**23**) (0.29 mmol) a rozpuštěno v minimálním množství tetrahydrofuranu (cca 2 ml). Ke směsi bylo přidáno 48 mg (0,35 mmol) K_2CO_3 , 5 ml methanolu a směs byla míchána 2 hodiny za laboratorní teploty. Směs byla poté odpařena za sníženého tlaku a pevný podíl byl převeden do 3 ml vody a byla přidána 5% HCl do neutrálního pH. Pevný podíl byl odfiltrován a surový produkt rekrystalován ze směsi ethanol a voda. Bylo získáno 0.65 g (72 %) bílé krystalické látky.

3-(4-Chlorfenyl)-7-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4H-1,3-benzoxazin-4-on (24)

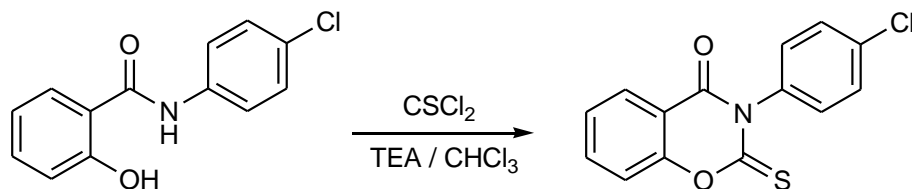
$C_{14}H_8ClNO_3S$ (305.74); t. t. 251-253 °C; ir (KBr): (C=O) 1722, (C-O) 1290, (C=S) 1087 cm^{-1} ; 1H NMR (CD_3COCD_3): δ 6.85 (d, 2.1 Hz, 1 H, $H-8$), 6.98 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.43-7.47 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.54-7.58 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.89 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-5$), 10.17 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 102.3, 108.7, 115.6, 126.7, 130.2, 130.4, 131.3, 134.7, 139.1, 140.6, 157.4, 157.8, 165.6, 183.9. Elementární analýza (%) pro $C_{14}H_8ClNO_3S$, Vypočteno: C, 55.00; H, 2.64; N, 4.58; S, 10.49. Nalezeno: C, 55.16; H, 2.79; N, 4.66; S, 10.36.

4.4.2.3 Pokus o přípravu 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-1,3-benzoxazin-4-onu



Do baňky bylo předloženo 0.16 g *N*-(4-chlorfenyl)-2,6-dihydroxybezamidu (**4b**) (0.6 mmol), 5 ml bezvodého chloroformu a 0.2 ml triethylaminu (2.4×0.6 mmol). Směs byla ochlazena a během 15 minut byla z dělicí nálevky přidána směs 0.055 ml thiofosgenu (1.2×0.6 mmol) ve 3 ml bezvodého chloroformu. Směs byla míchána 5 hodin za laboratorní teploty. Chloroformový roztok byl vytřepán 3 \times s vodou a po odpaření byla získána žlutá krystalická směs. Látka byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu, za použití mobilní fáze toluen:hexan (1:1) a poté rekrystalována z ethanolu. Bylo získáno 92 mg žluté krystalické látky (51 %). Podle NMR a t. t. se jedná o látku **19b** a nikoli o 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-1,3-benzoxazin-4-on (viz diskuse, kapitola 6.1).

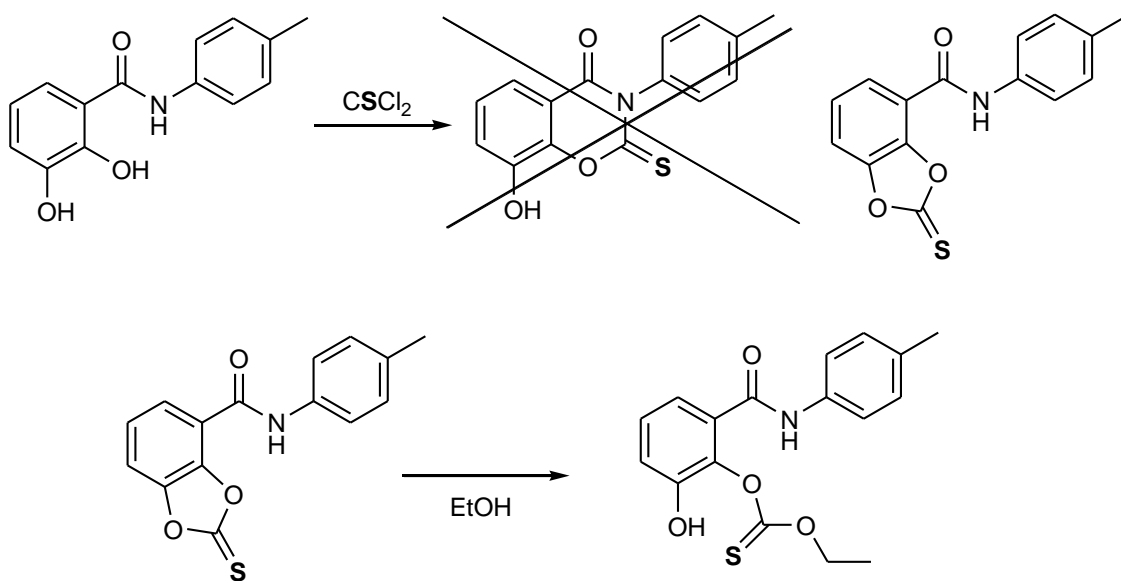
4.4.2.4 Příprava 3-(4-chlorfenyl)-2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-1,3-benzoxazin-4-onu (25)



Reakce probíhala analogickým způsobem jako předchozí reakce (viz 5.4.2.3). K reakci bylo použito 1 g *N*-(4-chlorfenyl)-2-hydroxybezamidu (4 mmol), 15 ml bezvodého chloroformu, 1.3 ml triethylaminu (9.6 mmol), 0.37 ml thiofosgenu (4.8 mmol). K čištění nebyla použita sloupcová chromatografie, ale surový produkt byl 2x čištěn rekrystalizací ze směsi ethanol a voda. Bylo získáno 0.9 g (76 %) bílé krystalické látky.

3-(4-Chlorfenyl)-2-thioxo-2,3-dihydro-4H-1,3-benzoxazin-4-on (25)

$C_{14}H_8ClNO_2S$ (289.74); t. t. 253-254 °C (lit.¹⁹⁰ 245 °C); ir (KBr): (C=O) 1729, (C=S) 1084 $cm^{-1}cm^{-1}$; 1H NMR (DMSO): δ 7.45-7.48 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.52 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $H-6$), 7.58-7.63 (m, 3 H, $H-8$, $H-2'$, $H-6'$), 7.89-7.95 (m, 1 H, $H-7$), 8.01 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $H-5$); ^{13}C NMR (DMSO): δ 116.0, 116.4, 126.5, 127.6, 129.7, 130.6, 133.6, 137.0, 138.0, 154.6, 157.6, 182.8. Elementární analýza nebyla prováděna, jedná se o známou látku.

4.4.2.5 Reakce 2,3-dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamidu s thiofosgenem.

Do baňky byl předložen 1 g (4.1 mmol) 2,3-dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)-benzamidu (**1d**), 1.13 ml triethylaminu (8.2 mmol) a 15 ml bezvodého chloroformu. Ke směsi bylo za laboratorní teploty přikapáváno 0,32 ml thiofosgenu (4.1 mmol) v 5 ml bezvodého chloroformu. Směs byla poté 3 hodiny míchána za laboratorní teploty a následně 2x protřepána s vodou. Chloroformová frakce byla odpařena a rekrystalována z toluenu. Bylo získáno 0.72 mg (62 %) bílé krystalické látky 2-thioxo-*N*-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzodioxol-4-karboxamidu (**26**).

Do Erlenmeyerovy baňky bylo předloženo 0.2 g 2-thioxo-*N*-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzodioxol-4-karboxamidu (**26**) (0.7 mmol) a ponecháno 3 minuty vařit v 5 ml ethanolu. Vyloučená bílá krystalická látky byla 1x krystalována z ethanolu a bylo

získáno 0.16 g (69 %) bílé krystalické látky *O*-ethyl-*O'*-{2-hydroxy-6-[(4-methylfenyl)karbamoyl]fenyl}-karbonothioátu (**27**).

2-Thioxo-*N*-(4-methylfenyl)-2*H*-1,3-benzodioxol-4-karboxamid (**26**)

C₁₅H₁₁NO₃S (285.22); t. t. 208-211; ir (KBr): (C=O) 1649, (C-O) 1278, (C=S) 1082 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 2.29 (s, 3 H, CH₃), 7.17-7.21 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.54 (t, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-6), 7.59-7.63 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.76-7.83 (m, 2 H, *H*-5, *H*-7). 10.44 (bs, 1 H, *NH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 20.7, 113.2, 120.0, 120.3, 125.2, 126.0, 129.4, 133.5, 136.1, 143.6, 146.2, 160.7, 183.9. Vypočtená elementární analýza pro C₁₅H₁₁NO₃S: C, 63.14; H, 3.89; N, 4.91; S, 11.24. Nalezeno: C, 63.24; H, 4.03; N, 4.84; S, 11.09.

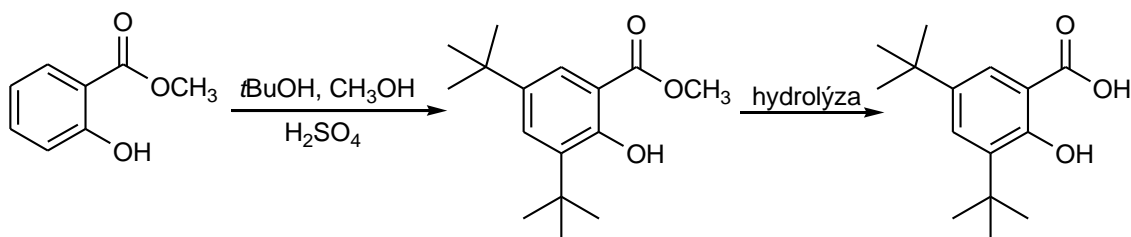
O-Ethyl-*O'*-{2-hydroxy-6-[(4-methylfenyl)karbamoyl]fenyl}-karbonothioát (**27**)

C₁₇H₁₇NO₄S (331.39); t. t. 139-141; ir (KBr): (C=O) 1600, (C-O) 1190, (C=S) 1045 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): 1.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 2.30 (s, 3 H, CH₃), 4.56 (q, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CH₂), 7.54 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-6), 7.18-7.22 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.36-7.41 (m, 1 H, *H*-7), 7.54-7.58 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.98-8.02 (m, 1 H, *H*-5), 10.49 (bs, 1 H, *NH*), 12.56 (bs, 1 H, *OH*); ¹³C NMR (DMSO): δ 13.7, 20.7, 71.0, 117.6, 118.4, 122.1, 126.3, 127.6, 129.3, 134.2, 135.0, 141.4, 152.4, 167.9, 194.2. Vypočtená elementární analýza pro C₁₇H₁₇NO₄S: C, 61.61; H, 5.17; N, 4.23; S, 9.68. Nalezeno: C, 61.50; H, 5.30; N, 4.31; S, 9.72.

4.5 Příprava hydroxyderivátů 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenylbenzamidů

4.5.1 Příprava 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů

4.5.1.1 Příprava 3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoové kyseliny (**28**)



Do tříhrdlé baňky opatřené příkapávací baňkou, teploměrem a chladičem byl předložen methyl-salicylát (17 ml, 0.13 mol) a *terc*-butanolu (30 ml, 0.31 mol) v 15 ml

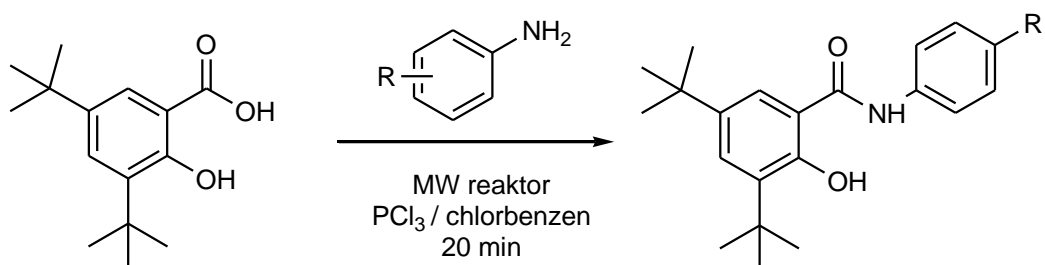
methanolu. Směs byla chlazená směsí voda-led-NaCl a za stálého míchání byla při teplotě 0 až +5 °C přikapávána konc. H₂SO₄ (50 ml). Po 20 minutách se vytvořila slabě růžová směs, která byla po přidání veškeré konc. H₂SO₄ míchána 15 hodin za laboratorní teploty. Výsledná směs byla odfiltrována a bílá krystalická látka promyta vodou a rekrystalována z methanolu. K vykrytalování bylo potřeba směs ponechat volně stát v chladicím boxu. Bylo získáno 27,4 g (79 %) methylesteru 3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoové kyseliny o t. t. 68-69 °C (lit.¹⁹¹ 72-73°C), který byl použit do dalšího kroku reakce.

Do baňky opatřené zpětným chladičem bylo předloženo 25 g (95 mmol) methylesteru 3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoové kyseliny, 50 ml methanolu, 10 ml vody a 10.7 g KOH. Směs byla zahřívána 3,5 hodiny a poté ochlazená. Směs byla okyselena 10% HCl do vzniku bílé krystalické látky, která byla zfiltrována a promyta vodou. Bylo získáno 17.7 g (75 %) 3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoové kyseliny (**28**).

3,5-Di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoová kyselina (**28**).

C₁₅H₂₂O₃ (250.33); t. t. 163-165 °C (lit.¹⁹¹ 164-165 °C); ir (KBr): (C=O) 1648, (C-O_{fenol}) 1232 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 1.24 (s, 9 H, CH₃), 1.36 (s, 9 H, CH₃), 7.46 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, *H*-4), 7.65 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, *H*-6), 12.50 (bs, 1 H, COOH), OH dnepozorován; ¹³C NMR (DMSO): δ 29.4, 31.3, 34.1, 34.8, 112.0, 124.0, 129.8, 136.4, 140.0, 158.9, 173.6. Elementární analýza nebyla prováděna, jedná se o známou látku.

4.5.1.2 Příprava 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů (**29a-f**)



Do destilační baňky byla předložena směs 3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoové kyseliny (**28**) (10 mmol) a odpovídajícího anilinu (15 mmol) v 90 ml chlorbenzenu. Ke směsi byl přidán PCl₃ (0.44 ml, 5 mmol) a směs byla ihned vložena do mikrovlnného reaktoru, kde byla za míchání při výkonu 600 W zahřívána po dobu 20 minut. Směs

byla ochlazená a odpařena do sucha za sníženého tlaku. Surový produkt byl poté čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze aceton-hexan (1:5). Produkt byl dále rekrystalován ze směsi ethanol-voda. Přehled připravených látek viz Tabulka č. 6

Tabulka č. 6: Přehled připravených 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů

Látka	R	Sumární vzorec M (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
29a	H	C ₂₁ H ₂₇ NO ₂ 325.44	174-176 (lit. ¹⁹²)	41
29b	4-Cl	C ₂₁ H ₂₆ ClNO ₂ 359.89	133-135	54
29d	4-CH ₃	C ₂₂ H ₂₉ NO ₂ 339.47	155-157	62
29f	4-OCH ₃	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃ 355.47	178-180	65

3,5-Di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamid (29a).

ir (KBr): (C=O) 1624, (NH) 1531, (C-O_{fenol}) 1251 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 1.32 (s, 9 H, CH₃), 1.39 (s, 9 H, CH₃), 7.17-7.24 (m, 1 H, *H*-4'), 7.37-7.41 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.44 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, *H*-4), 7.60-7.63 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.84 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, *H*-6), 10.45 (bs, 1 H, OH), 13.06 (s, 1 H, NH); ¹³C NMR (DMSO): δ 29.4, 31.5, 34.5, 34.9, 113.9, 122.1, 123.2, 125.1, 128.4, 128.8, 136.6, 137.6, 139.8, 158.5, 170.4. Elementární analýza (%) pro C₂₁H₂₇NO₂, Vypočteno: C, 77.50; H, 8.36; N, 4.30. Nalezeno: C, 77.39; H, 8.47; N, 4.42.

Lit.¹⁹² ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.30 (s, 9 H), 1.40 (s, 9 H), 7.1-7.9 (m, 9 H), 14.20 (s, 1 H).

3,5-Di-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid (29b).

ir (KBr): (C=O) 1627, (NH) 1529, (C-O_{fenol}) 1251 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 1.31 (s, 9 H, CH₃), 1.38 (s, 9 H, CH₃), 3.77 (s, 3 H, OCH₃), 7.42-7.48 (m, 3 H, *H*-4, *H*-3', *H*-5'), 7.62-7.69 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.81-7.83 (m, 1 H, *H*-6), 10.52 (s, 1 H, OH), 12.90 (s, 1 H, NH); ¹³C NMR (DMSO): δ 29.54, 31.6, 34.6, 35.0, 113.9, 122.9, 124.6, 128.6, 128.8,

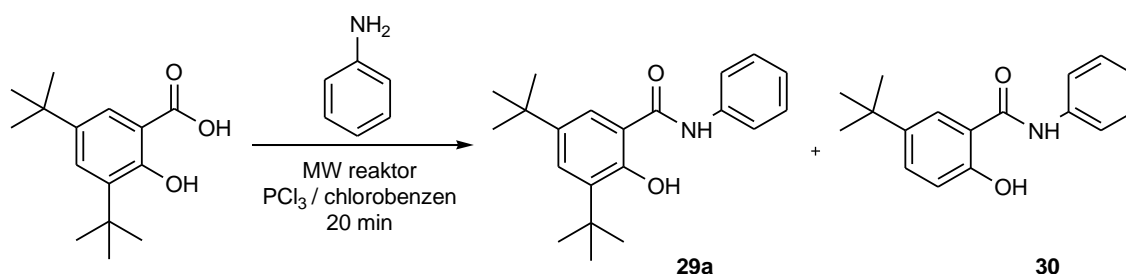
129.0, 136.8, 136.8, 140.0, 158.5, 170.5. Elementární analýza (%) pro $C_{21}H_{26}ClNO_2$, Vypočteno: C, 70.08; H, 7.28; N, 3.89. Nalezeno: C, 70.22; H, 7.16; N, 3.96.

3,5-Di-*tert*-butyl-2-hydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (29d).

ir (KBr): (C=O) 1626, (NH) 1526, (C-O_{fenol}) 1252 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 1.31 (s, 9 H, CH_3), 1.39 (s, 9 H, CH_3), 2.31 (s, 3 H, CH_3), 7.18-7.22 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.43 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.48-7.51 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.84 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-6$), 10.40 (s, 1 H, OH), 13.14 (s, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 20.7, 29.4, 31.6, 34.5, 34.9, 113.9, 122.1, 123.1, 128.2, 129.2, 134.2, 135.0, 136.6, 139.7, 158.5, 170.2. Elementární analýza (%) pro $C_{22}H_{29}NO_2$, Vypočteno: C, 77.84; H, 8.61; N, 4.13. Nalezeno: C, 77.75; H, 8.50; N, 4.25.

3,5- Di-*tert*-butyl-2-hydroxy-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (29f).

ir (KBr): (C=O) 1628, (NH) 1513, (C-O_{fenol}) 1246 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 1.32 (s, 9 H, CH_3), 1.38 (s, 9 H, CH_3), 3.77 (s, 3 H, OCH_3), 6.96-6.99 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.42 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 7.48-7.51 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.83 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-6$), 10.36 (s, 1 H, OH), 13.23 (s, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 29.4, 31.6, 34.5, 34.9, 55.4, 113.8, 113.9, 122.0, 124.9, 128.2, 130.3, 136.6, 139.7, 156.8, 158.5, 170.1. Elementární analýza (%) pro $C_{22}H_{29}NO_3$, Vypočteno: C, 74.33; H, 8.22; N, 3.94. Nalezeno: C, 74.19; H, 8.40; N, 3.97.



Při izolaci produktu **29a** pomocí sloupcové chromatografie byl izolován vedlejší produkt, který byl identifikován jako 5-*tert*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamid (**30**).

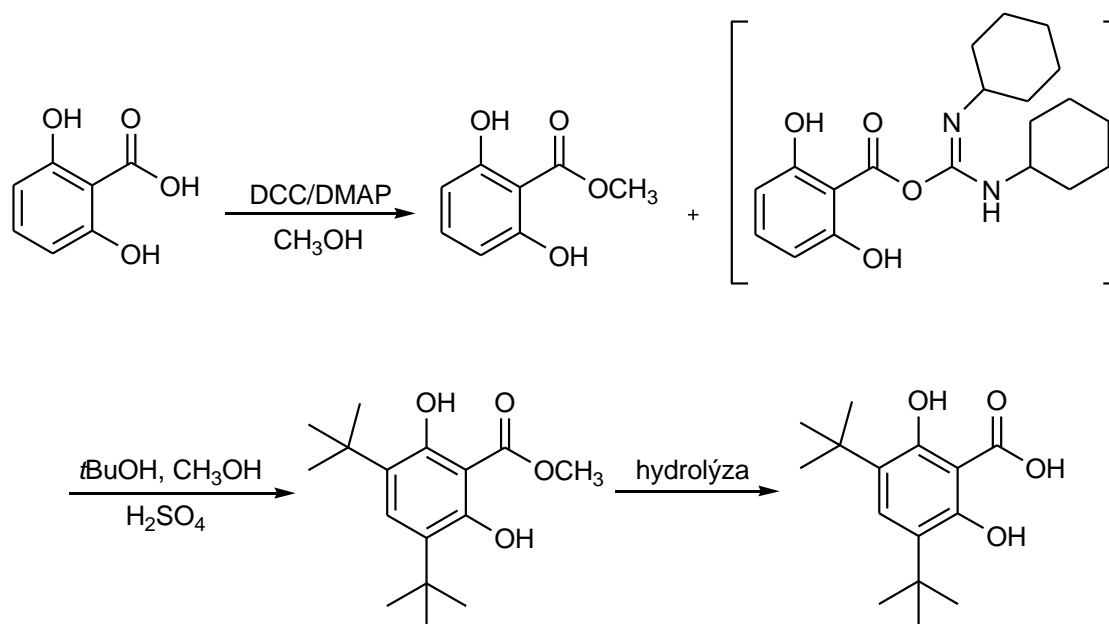
5-*tert*-Butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamid (30).

$C_{17}H_{19}NO_3$ (269.34); t. t. 165-167 °C (lit.¹⁹³ 169-170 °C); výtěžek = 17 %; ir (KBr): (C=O) 1629, (NH) 1556 cm^{-1} ; 1H NMR (CD_3COCD_3): δ 1.33 (s, 9 H, CH_3), 6.92 (d, $J =$

8.7 Hz, 1 H, *H*-3), 7.14-7.20 (m, 1 H, *H*-4'), 7.36-7.41 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.55 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.7 Hz, 1 H, *H*-4), 7.68-7.72 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 8.00 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, *H*-6), 9.91 (bs, 1 H, *OH*), 11.99 (s, 1 H, *NH*); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3): δ 31.6, 34.8, 115.5, 118.3, 122.6, 124.6, 125.4, 129.5, 132.5, 138.8, 142.3, 150.0, 169.6. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_3$, Vypočteno: C, 75.81; H, 7.11; N, 5.20. Nalezeno: C, 74.19; H, 8.40; N, 3.97.

4.5.2 Příprava 3,5-di-*tert*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxy-benzamidů

4.5.2.1 Příprava 3,5-di-*tert*-butyl-2,6-dihydroxybenzoové kyseliny (34)



2,6-Dihydroxybenzoová kyselina (3 g, 19.47 mmol) byla rozpuštěna ve 30 ml methanolu a 100 ml dichlormethanu. K reakční směsi byl přidán dicyklohexylkarbodiimid (DCC) (4,5 g, 21.81 mmol) a 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP) (0,5 g, 4,1 mmol) a směs byla míchána 4 dny za laboratorní teploty. Bílá heterogenní směs byla zfiltrována a filtrát byl odpařen do sucha. K surové směsi byl přidán hexan a bílá nerozpustná látka byla izolována filtrací. Bylo získáno 1.6 g (49 %) methylesteru 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny (31).

Filtrát byl odpařen do sucha a čištěn flash chromatografií, jako mobilní fáze byl použit hexan. Byly izolovány 1,3 g (19 %) esteru 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny

s DCC jako vedlejší produkt, tj. anhydrid *N,N'*-dicyklohexylkarbamidoimidové a 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny (**32**).

V případě použití diisopropylkarbodiimidu (DII) za stejných podmínek byl získán 59% výtěžek methylesteru-2,6-dihydroxybenzoové kyseliny (**31**).

Alkylace byla porváděna podle (viz kapitola 4.5.1.1) a bylo použito 9 g (54 mmol) methyl-2,6-dihydroxybenzoátu (**31**), 16 ml *tert*-butylalkoholu (0.17 mol), 8 ml methanolu a 24 ml konc. H₂SO₄. Směs byla míchána 3 hodin za laboratorní. Bylo získáno 11 g methylesteru 3,5-di-*tert*-butyl-2,6-hydroxybenzoové kyseliny (**33**), který byl poté použit do dalšího kroku reakce.

Do baňky opatřené zpětným chladičem bylo předloženo 10,5 g (37,45 mmol) methylesteru 3,5-di-*tert*-butyl-2,6-hydroxybenzoové kyseliny (**33**), 22 ml methanolu, 6 ml vody a 5 g KOH. Směs byla zahřívána 2 hodiny a poté ochlazena. Směs byla okyselena 10% HCl do vzniku bílé krystalické látky, která byla odfiltrována a promyta vodou. Bylo získáno 7,2 g 3,5-di-*tert*-butyl-2,6-hydroxybenzoové kyseliny (**34**). Přehled připravených derivátů viz Tabulka č. 7.

Tabulka č. 7 Přehled připravených látek při přípravě 3,5-di-*tert*-butyl-2,6-dihydroxybenzoové kyseliny

Látka	Název	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (°C)	Výtěžek (%)
31	Methyl-2,6-dihydroxybenzoát	C ₈ H ₈ NO ₄ 168.15	62-63 (58-60 ¹⁹⁴)	49 (59)
32	Anhydrid <i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbamidoimidové a 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₄ 360.45	114-115	19
33	Methyl-3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2,6-dihydroxybenzoát	C ₁₆ H ₂₄ O ₄ 280.36	104-106 (lit. ¹⁹⁵)	73
34	3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-2,6-dihydroxybenzoová kyselina	C ₁₅ H ₂₂ O ₄ 266.33	166.5-168 (173.5 ¹⁹⁶)	72

Methyl-2,6-dihydroxybenzoát (31**).**

ir (KBr): (C=O) 1631, (C-O_{ester}) 1193 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO): δ 3.78 (s, 3 H, CH₃), 6.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, *H*-3, *H*-5), 7.09 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-4), 9.96 (bs, 2 H, OH);

^{13}C NMR (DMSO): δ 52.2, 107.0, 107.3, 132.6, 157.6, 168.6. Elementární analýza nebyla prováděna, jedná se o známou látku.

Anhydrid *N,N'*-dicyklohexylkarbamidoimidové a 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny (32).

ir (KBr): (C=O) 1666, 1610, (C-O_{fenol}) 1234 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.15-1.91 (m, 20 H, H-cyklohexyl), 2.47-2.61 (m, 2 H), 3.71-3.81 (m, 1 H), 4.76-4.88 (m, 1 H), 6.51 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, *H*-3), 6.64 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, *H*-5), 7.36 (t, J = 8.4 Hz, 1 H, *H*-4), 11.63 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 24.3, 25.4, 26.0, 26.4, 28.3, 33.8, 53.3, 55.5, 100.6, 104.6, 111.4, 135.8, 137.7, 153.1, 160.8, 165.0. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$, Vypočteno: C, 66.64; H, 7.83; N, 7.77. Nalezeno: C, 66.82; H, 7.92; N, 7.61.

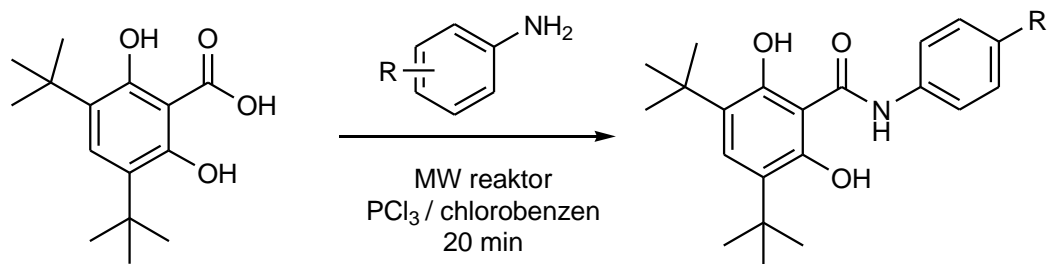
Methyl-3,5-di-*tert*-butyl-2,6-dihydroxybenzoát (33).

ir (KBr): (C=O) 1666, (C-O_{ester}) 1217 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 1.33 (s, 18 H, CH_3), 3.99 (s, 3 H, OCH_3), 7.32 (s, 1 H, *H*-4), 10.35 (bs, 2 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 29.7, 34.4, 53.3, 101.4, 125.8, 131.0, 156.7, 171.5. Elementární analýza nebyla prováděna, jedná se o známou látku.

3,5-Di-*tert*-butyl-2,6-dihydroxybenzoová kyselina(34).

ir (KBr): (C=O) 1635, (C-O_{fenol}) 1219, 1191 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 1.31 (s, 18 H, CH_3), 4.51-6.31 (bs, 2 H, OH), 7.18 (s, 1 H, *H*-4); ^{13}C NMR (DMSO): δ 29.8, 34.3, 102.0, 124.3, 129.1, 158.3, 174.9. Elementární analýza nebyla prováděna, jedná se o známou látku.

4.5.2.2 Příprava 3,5-di-*tert*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů (35a-f)



Do destilační baňky byla předložena směs 3,5-di-*terc*-butyl-2,6-dihydroxybenzoové kyseliny (**34**) (10 mmol) a odpovídajícího anilinu (15 mmol) v 90 ml chlorbenzenu. Ke směsi byl přidán PCl_3 (0.44 ml, 5 mmol) a směs byla ihned vložena do mikrovlnného reaktoru, kde byla za míchání při výkonu 600 W zahřívána po dobu 20 minut. Směs byla poté ochlazena a odpařena do sucha za sníženého tlaku. Surový produkt byl poté čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze aceton-hexan (1:5). Produkt byl rekrystalován ze směsi ethanol-voda. Přehled připravených derivátů viz Tabulka č. 8.

Tabulka č. 8: Přehled připravených 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů

Látka	R	Sumární vzorec M ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	T. t. ($^{\circ}\text{C}$)	Výtěžek (%)
35a	4-H	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ 341.44	168-170	51
35b	4-Cl	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClNO}_3$ 375.89	162.5-164	53
35d	4- CH_3	$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ 355.47	169-171	49
35f	4- OCH_3	$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ 371.47	174-177	44

3,5-Di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamid (35a**).**

ir (KBr): (C=O) 1627, (NH) 1530, (C- O_{fenol}) 1214, 1193 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 1.36 (s, 18 H, CH_3), 7.22 (s, 1 H, $H-4$), 7.38-7.42 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.49-7.53 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.33 (bs, 2 H, OH), 10.71 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 30.1, 34.5, 111.0, 122.7, 127.4, 128.1, 128.3, 128.5, 137.0, 154.1, 168.6. Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_3$, Vypočteno: C, 73.87; H, 7.97; N, 4.10. Nalezeno: C, 73.68; H, 8.05; N, 4.05.

3,5-Di-*terc*-butyl-*N*-(4-chlorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (35b**).**

ir (KBr): (C=O) 1624, (NH) 1529, (C- O_{fenol}) 1215, 1194 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO): δ 1.36 (s, 18 H, CH_3), 7.23 (s, 1 H, $H-4$), 7.41-7.44 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.71-7.75 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.28 (bs, 2 H, OH), 10.51 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 30.1,

34.5, 111.1, 122.8, 127.7, 128.0, 128.7, 128.8, 137.1, 154.0, 168.8. Elementární analýza (%) pro $C_{21}H_{26}ClNO_3$, Vypočteno: C, 67.10; H, 6.97; N, 3.73. Nalezeno: C, 67.26; H, 7.11; N, 3.61.

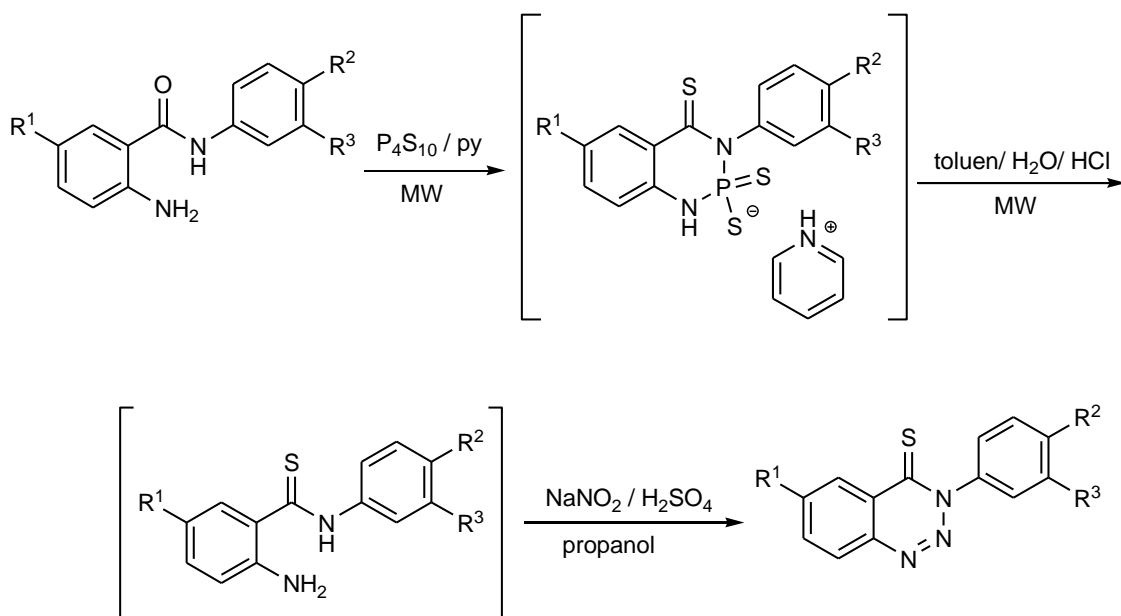
3,5-Di-*tert*-butyl-2,6-dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (35d).

ir (KBr): (C=O) 1626, (NH) 1533, (C-O_{fenol}) 1212, 1193 cm^{-1} ; 1H NMR (CD_3COCD_3): δ 1.42 (s, 18 H, CH_3), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 7.17-7.21 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.39 (s, 1 H, $H-4$), 7.56-7.60 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.51 (bs, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 20.8, 30.6, 35.2, 109.0, 121.8, 129.3, 129.7, 130.1, 134.8, 136.2, 156.1, 170.2. Elementární analýza (%) pro $C_{22}H_{29}NO_3$, Vypočteno: C, 75.81; H, 7.11; N, 5.20. Nalezeno: C, 74.19; H, 8.40; N, 3.97.

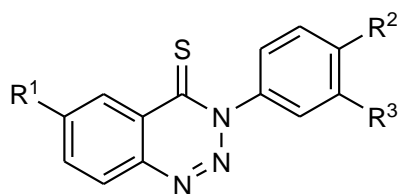
3,5-di-*tert*-Butyl-2,6-dihydroxy-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (35f).

ir (KBr): (C=O) 1633, (NH) 1537, (C-O_{fenol/ether}) 1207, 1217, 1229 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO): δ 1.36 (s, 18 H, CH_3), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 6.93-6.96 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.23 (s, 1 H, $H-4$), 7.57-7.60 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 10.40 (bs, 1 H, NH), 10.65 (bs, 1 H, OH); ^{13}C NMR (DMSO): δ 30.1, 34.5, 55.4, 110.3, 114.0, 122.9, 127.6, 129.0, 130.9, 154.5, 156.3, 168.6. Elementární analýza (%) pro $C_{22}H_{29}NO_4$, Vypočteno: C, 71.13; H, 7.87; N, 3.77. Nalezeno: C, 71.27; H, 7.99; N, 3.74.

4.6 Příprava derivátů 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionu



Směs 2-amino-*N*-fenylbenzamidů (0.01 mol) a P_4S_{10} (0.01 mol) ve 20 ml bezvodého pyridinu byla míchána a zahřívána v mikrovlnném reaktoru při výkonu 500 W po dobu 60 minut (3x20 minut). Pozorovaná teplota během reakce byla v rozmezí 113-116 °C. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC za použití mobilní fáze ethyl-acetát:hexan (1:3), dokud výchozí látka nezreaovala. Směs byla poté nalita do směsi 150 ml toluenu a 150 ml vody a okyselena na $pH \approx 1-2$ konc. HCl. Směs byla poté zahřívána v mikrovlnném reaktoru při výkonu W 500 po dobu 60 minut (3x20 minut), pozorovaná teplota byla 86-90 °C a byla monitorována pomocí TLC za použití mobilní fáze ethyl-acetát:hexan (1:3). Toluenní vrstva byla odpařena a surová směs byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs ethyl-acetát:hexan (1:10). Žlutá krystalická látka byla bez rekrystalizace použita do následujícího kroku. Surový thioantranililid byl rozpuštěn v 5 ml 1.5M H_2SO_4 a 5 ml propanolu a roztok byl za stálého míchání ochlazen v ledové lázni na teplotu 0-2 °C. Ke směsi bylo přikapáno ekvimolární množství (bráno na suchý surový produkt) $NaNO_2$ v 1-2 ml vody. Směs byla míchána 2 hodiny za laboratorní teploty za nepřístupu světla, pevný surový produkt byl poté odfiltrován a 2-3x rekrystalován z ethanolu, za vzniku žluté krystalické látky. Přehled připravených derivátů viz Tabulka č. 9.



Tabulka č. 9: Přehled připravených 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thionů

Látka	R ¹	R ²	R ³	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (lit.)	Výtěžek (%)
36	H	H	H	C ₁₃ H ₉ N ₃ S 239.3	164-166	61
37	H	CH ₃	H	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ S 253.3	189-191	52
38	H	CH ₂ CH ₃	H	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ S 267.4	147-149	48

Tabulka č. 9: pokračování

Látka	R ¹	R ²	R ³	Sumární vzorec <i>M</i> (g·mol ⁻¹)	T. t. (lit.)	Výtěžek (%)
39	H	CH(CH ₃) ₂	H	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ S 281.4	137-138	45
40	H	Br	H	C ₁₃ H ₈ BrN ₃ S 318.2	196-198	51
41	H	Cl	H	C ₁₃ H ₈ ClN ₃ S 273.7	184-186	59
42	H	Cl	Cl	C ₁₃ H ₇ Cl ₂ N ₃ S 308.2	158-160	49
43	Cl	Cl	H	C ₁₃ H ₇ Cl ₂ N ₃ S 308.2	180-182	41
44	H	Cl	Cl	C ₁₈ H ₁₄ Cl ₂ N ₃ PS ₃ 470.4	145-147	80

3-Fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thion (36)

¹H NMR (DMSO): δ 7.51-7.61 (m, 5 H, *H*-2', *H*-6'), 8.03 (dt, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-6), 8.17 (dt, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-7), 8.27 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-8), 8.65 (dd, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*-5); ¹³C NMR (DMSO) δ 126.2, 127.6, 128.5, 129.3, 129.5, 129.6, 135.1, 135.5, 136.3, 143.2, 180.6 (C=S). Elementární analýza (%) pro C₁₃H₉N₃S, Vypočteno: C, 65.25; H, 3.79; N, 17.56; S, 13.40. Nalezeno: C, 65.00; H, 3.64; N, 17.26; S, 13.60.

3-(4-Methylfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thion (37)

¹H NMR (DMSO): δ 2.41 (s, 3 H, CH₃), 7.38-7.40 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.46-7.79 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 8.02 (td, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-6), 8.16 (td, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-7), 8.26 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-8), 8.64 (dd, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1 H, *H*-5); ¹³C NMR (DMSO) δ 21.1, 126.2, 127.3, 128.5, 129.3, 129.9, 135.0, 135.5, 136.2, 139.2, 140.8, 180.8 (C=S). Elementární analýza (%) pro C₁₄H₁₁N₃S, Vypočteno: C, 66.38; H, 4.38; N, 16.59; S, 12.66. Nalezeno: C, 65.95; H, 4.24; N, 16.37; S, 12.78.

3-(4-Ethylfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion (38)

^1H NMR (CDCl_3): δ 1.32 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, CH_3), 2.77 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 7.40-7.43 (m, 2 H, $H\text{-}3'$, $H\text{-}5'$), 7.44-7.47 (m, 2 H, $H\text{-}2'$, $H\text{-}6'$), 7.86 (td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}6$), 7.99 (td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}7$), 8.18 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}8$), 8.80 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}5$); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 15.2, 28.6, 126.7, 126.8, 128.3, 129.1, 129.1, 134.1, 135.1, 135.5, 140.5, 145.8, 181.1 (C=S). Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}$, Vypočteno: C, 67.39; H, 4.90; N, 16.72; S, 11.99. Nalezeno: C, 67.27; H, 4.75; N, 16.61; S, 11.86.

3-(4-Isopropylfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion (39)

^1H NMR (CDCl_3): δ 1.31 (d, $J = 6.9$ Hz, 6 H, $2\times\text{CH}_3$), 2.94-3.10 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1 H, CH), 7.40-7.46 (m, 4 H, $H\text{-}2'$, $H\text{-}3'$, $H\text{-}5'$, $H\text{-}6'$), 7.84 (td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}6$), 7.96 (td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}7$), 8.15 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}8$), 8.78 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}5$); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 23.8, 33.9, 126.7, 126.8, 127.4, 129.1, 129.1, 134.1, 135.1, 135.5, 140.5, 150.3, 181.1 (C=S). Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{S}$, Vypočteno: C, 68.30; H, 5.37; N, 14.93; S, 11.40. Nalezeno: C, 68.04; H, 5.31; N, 15.19; S, 11.20.

3-(4-Bromfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion (40)

^1H NMR (DMSO) δ 7.59-7.62 (m, 2 H, $H\text{-}3'$, $H\text{-}5'$), 7.80-7.83 (m, 2 H, $H\text{-}2'$, $H\text{-}6'$), 8.04 (td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}6$), 8.17 (td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}7$), 8.28 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}8$), 8.64 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}5$); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 122.8, 126.2, 128.4, 129.4, 130.0, 132.6, 135.2, 135.5, 136.4, 142.5, 180.9 (C=S). Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{BrN}_3\text{S}$, Vypočteno: C, 49.07; H, 2.53; N, 13.21; S, 10.08. Nalezeno: C, 49.21; H, 2.65; N, 13.16; S, 9.90.

3-(4-Chlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion (41)

^1H NMR (DMSO) δ 7.64-7.70 (m, 4 H, $H\text{-}2'$, $H\text{-}3'$, $H\text{-}5'$, $H\text{-}6'$), 8.03 (td, $J = 0.9$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H\text{-}6$), 8.17 (td, $J = 0.9$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H\text{-}7$), 8.28 (dd, $J = 0.9$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H\text{-}8$), 8.64 (dd, $J = 0.9$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H\text{-}5$); ^{13}C NMR (DMSO) δ 126.1, 128.4, 128.5, 129.4, 130.1, 131.6, 131.8, 132.5, 135.3, 135.4, 136.5, 142.7, 181.0 (C=S). Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{S}$, Vypočteno: C, 57.04; H, 2.95; N, 15.35; S, 11.71. Nalezeno: C, 56.88; H, 2.76; N, 15.04; S, 11.80.

3-(3,4-Dichlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion (42)

^1H NMR (DMSO) δ 7.69 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-6'$), 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-5'$), 8.02-8.08 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6$), 8.19 (td, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-7$), 8.29 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-8$), 8.65 (dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-5$); ^{13}C NMR (DMSO) δ 126.1, 128.4, 128.5, 129.4, 130.1, 131.6, 131.8, 132.5, 135.3, 135.4, 136.5, 142.7, 181.0 (C=S). Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_3\text{S}$, Vypočteno: C, 50.67; H, 2.29; N, 13.67; S, 10.40. Nalezeno: C, 50.52; H, 2.38; N, 13.65; S, 10.28.

6-Chlor-3-(4-chlorfenyl)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thion (43)

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.46-7.49 (m, 2 H, $H-3'$, $H-5'$), 7.54-7.57 (m, 2 H, $H-2'$, $H-6'$), 7.91 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-7$), 8.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $H-8$), 8.74 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, $H-5$); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 127.6, 128.4, 128.5, 129.7, 130.9, 133.8, 135.6, 135.8, 140.9, 141.1, 179.6 (C=S). Elementární analýza (%) pro $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_3\text{S}$, Vypočteno: C, 50.67; H, 2.29; N, 13.67; S, 10.40. Nalezeno: C, 50.60; H, 2.42; N, 13.85; S, 10.30.

Pyridinium-3-(3,4-dichlorfenyl)-2,4-dithioxo-3,4-dihydro-1,3,2 λ^5 -benzodiaza-fosfinin-2-thiolát (44)

Tento meziprodukt byl připraven zahříváním 2-amino-*N*-(3,4-dichlorfenyl)thiobenzamidu (0.08 g, 0.27 mmol) s P_4S_{10} (0.12 g, 0.27 mmol) v 10 pyridinu v mikrovlnném reaktoru. Reakce byla prováděna při výkonu reaktoru 500 W po dobu 20 minut. Po ochlazení byla směs nalita na drcený led a ponechána stát. Žlutá krystalická látka byla odfiltrována a rekrystalována z ethanlu. Bylo získáno 0.1 g (80 %) žluté krystalické látky. Charakterizace látky viz níže.

^1H NMR (DMSO) δ 6.85 (t, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-7$), 6.96 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-8$), 7.25-7.29 (m, 1 H, $H-6'$), 7.33-7.39 (m, 1 H, $H-6$), 7.53-7.54 (m, 1 H, $H-2'$), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $H-5'$), 8.01-8.07 (m, 2 H, *py-H3*, *py-H5*), 8.35 (dd, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, $H-5$), 8.54-8.62 (m, 1 H, *pyH-4*), 8.80-8.93 (m, 2 H, *pyH-2*), *pyH-6*), 9.03 (bs, 1 H, *NH*); ^{13}C NMR (DMSO) δ 117.7, 118.6, 123.1, 126.7, 129.0, 129.4, 130.3, 131.2, 132.8, 133.8, 140.7, 142.2, 142.8, 145.6, 194.6 (C=S).

4.7 Metody používané v experimentální části

Výchozí sloučeněny byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, 2-hydroxy-4-methoxy-*N*-(4-methylthiazol-2-yl)benzamid byl poskytnut prof. K. Waissere. Tenkovrstvá chromatografie TLC (UV detekce) byla prováděna na hliníkových foliích pokrytých silikagelem 60 F₂₅₄ (Merck), sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu 60 (Merck). Mobilní fáze použité při chromatografii byly tvořeny rozpouštědly aceton p. a., hexan, ethyl-acetát p. a., toluen p. a. v různých poměrech uvedených u jednotlivých postupů.

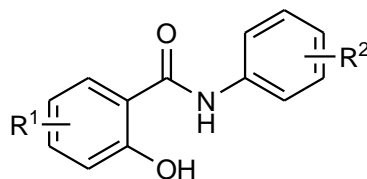
Teplota tání byla stanovena na automatickém přístroji Büchi Melting Point B-545. Elementární analýza byla prováděna na přístroji Perkin-Elmer 2400 CHNS/O analyzátor. Infračervená spektroskopie (IR) byla měřena na přístroji Nicolet Impact 400 spectrometer v tabletách KBr. Při reakcích v mikrovlnném reaktoru byl použit přístroj MicroSYNTH (MLS ETHOS 1600 URM). ¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury-Vx BB 300 (300 MHz) a Bruker AC 250 (250 MHz). Látky byly před vlastním měřením rozpuštěny v deuterovaném rozpouštědle: dimethylsulfoxid (DMSO-*d*₆), chloroform (CDCl₃) nebo aceton (aceton-*d*₆). Chemický posun δ je udáván v jednotkách ppm vzhledem k tetramethylsilanu jako standardu. 2D NMR experimenty byly prováděny na přístroji Varian Mercury-Vx BB 300 (300 MHz).

5 Výsledky hodnocení biologické aktivity

5.1 Antimykobakteriální aktivita

Testování antimykobakteriální aktivity připravených látek bylo provedeno na Oddělení pro diagnostiku mykobakterií ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. Hodnocení bylo realizováno *in vitro* na kmenech získaných z České národní sbírky typových kultur (CNCTC) *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 330/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80 a kmeni *M. kansasii* 6509/96 izolovaném z klinického vzorku od pacienta. Antimykobakteriální aktivita látek byla stanovena na Šulově semisyntetické půdě (SEVAC, Praha). Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu, stupnice výsledné koncentrace byla 1000, 500, 250, 125, 62.5, 32, 16, 8, 4, 2 a 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), která byla stanovena po 7 (pouze *M. kansasii*), 14 a 21 dnech při inkubaci při 37 °C, je nejnižší koncentrace testované látky, při které ještě dochází k inhibici růstu. Jako standard bylo použito antituberkulotikum isoniazid (INH).

5.1.1 Antimykobakteriální hodnocení *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů



	R¹		R²		R²
1	3-OH	a	H	h	4-C(CH ₃) ₂
2	4-OH	b	4-Cl	i	4-[CH ₂] ₃ CH ₃
3	5-OH	c	4-F	j	4-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
4	6-OH	d	4-CH ₃	k	4-CH ₂ C ₆ H ₅ *
5	3-OCH ₃	e	3-CH ₃		
6	6-OCH ₃	f	4-OCH ₃		
7	3,4-OH	g	4-CH ₂ CH ₃		

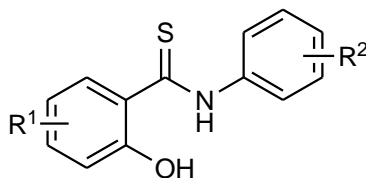
* Substituent na *N* místo fenylu

Tabulka č. 10: Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) *N*-fenyl-dihydroxybezamidů

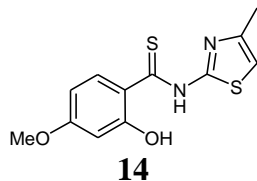
Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
1a	125	250	500	500	250	250	500	250	500	500
1b	250	500	500	500	250	500	500	125	250	500
1d	250	500	500	500	250	500	500	125	250	500
1f	125	250	500	500	250	250	250	250	500	500
1g	125	250	500	500	250	500	500	250	500	500
1h	250	250	500	500	250	500	500	250	250	250
2a	16	32	62,5	125	125	125	250	62,5	125	125
2b	8	16	62,5	125	32	62,5	125	32	62,5	125
2d	16	32	32	62,5	62,5	125	125	125	125	125
2f	16	32	62,5	125	125	125	250	62,5	62,5	62,5
2h	8	16	32	62,5	32	62,5	62,5	16	16	16
3a	125	125	1000	1000	250	500	500	250	500	500
3b	125	125	500	1000	250	250	250	250	250	250
3d	125	125	500	1000	250	500	500	250	250	500
3f	62,5	125	1000	1000	250	250	500	125	250	500
3g	16	32	>500	>500	62,5	62,5	125	32	32	62,5
4a	32	62,5	62	125	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5
4b	32	62,5	32	62,5	16	32	62,5	16	32	32
4c	62,5	125	250	250	62,5	125	125	62,5	125	125
4d	62,5	62,5	32	62,5	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5
4e	62,5	125	250	250	62,5	125	250	62,5	125	125
4f	32	62,5	125	250	62,5	125	250	62,5	125	125
4i	32	32	62,5	125	32	62,5	62,5	32	32	62,5
4k	125	250	250	250	32	62,5	62,5	125	125	125
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

Tabulka č. 10: pokračování

Látka	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. kansasii</i>			<i>M. kansasii</i>		
	My 331/88		My 330/88		My 235/80			6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
6d	250	250	32	32	32	62,5	62,5	125	125	125
7b	125	250	1000	1000	125	250	500	250	500	500
7d	125	125	1000	1000	250	500	500	250	500	500
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

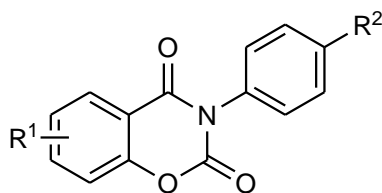
5.1.2 Antimykobakteriální hodnocení *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidů

	R¹		R²		R²
8	3-OH	a	H	g	4-CH ₂ CH ₃
9	4-OH	b	4-Cl	h	4-C(CH ₃) ₂
10	5-OH	c	4-F	i	4-[CH ₂] ₃ CH ₃
11	6-OH	d	4-CH ₃	j	4-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
12	3-OCH ₃	e	3-CH ₃	k	4-CH ₂ C ₆ H ₅ *
13	6-OCH ₃	f	4-OCH ₃		

* Substituent na *N* místo fenylu

Tabulka č. 11: Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) *N*-fenyl-dihydroxythio-benzamidů

Látka	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. kansasii</i>			<i>M. kansasii</i>		
	My 331/88		My 330/88		My 235/80			6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
8a	125	250	250	500	250	250	500	125	250	500
8b	125	250	250	250	125	250	500	125	250	250
8c	125	250	250	500	125	250	500	125	250	250
8d	125	250	250	500	250	250	500	125	250	250
8g	62,5	62,5	62,5	125	65,5	125	125	62,5	125	125
8j	125	250	125	250	125	250	250	125	125	250
9b	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
9d	16	32	32	32	62,5	62,5	125	32	62,5	62,5
9h	16	32	8	16	32	62,5	62,5	16	16	32
10a	62,5	125	500	1000	125	250	250	125	250	250
10b	125	125	500	1000	250	500	500	250	250	500
10g	62,5	125	500	500	125	250	250	62,5	125	500
11a	125	125	250	500	125	250	500	125	250	250
11b	125	125	125	250	62,5	125	250	62,5	125	125
11e	125	250	250	250	125	250	250	125	250	250
11i	125	250	125	125	125	125	250	62,5	125	250
11k	250	250	250	250	32	125	125	125	250	250
12d	2	4	16	32	8	8	16	16	16	16
13d	16	16	32	32	8	16	16	8	16	16
14	62,5	62,5	125	125	32	62,5	125	62,5	125	125
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

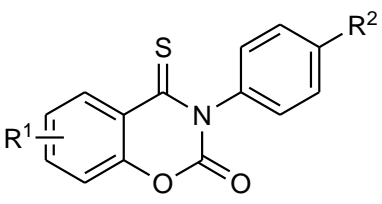
5.1.3 Antimykobakteriální hodnocení 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

	R ¹		R ²
15	8-OH	a	H
16	7-OH	b	4-Cl
17	6-OH	d	4-CH ₃
18	5-OH	f	4-OCH ₃
		i	4-[CH ₂] ₃ CH ₃

Tabulka č. 12: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

Látka	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. kansasii</i>			<i>M. kansasii</i>		
	My 331/88		My 330/88		My 235/80			6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
15b	125	250	500	500	125	250	250	125	250	500
15d	125	250	500	500	500	500	500	250	250	250
15f	125	250	500	500	250	500	500	250	500	500
16a	125	125	250	250	250	500	500	125	125	250
16b	16	32	125	125	62.5	125	250	32	62.5	125
16d	16	16	125	250	125	250	250	62.5	125	250
16f	32	62.5	250	500	125	250	500	62.5	125	125
17a	62,5	125	1000	1000	250	500	500	250	250	500
17b	62,5	125	250	500	125	250	500	125	250	500
17d	62,5	62,5	500	1000	125	250	500	125	250	500
17f	62,5	62,5	1000	1000	250	500	500	250	500	500
18a	32	62,5	32	62,5	32	62,5	125	32	62,5	125
18b	16	32	16	32	16	32	62,5	16	32	62,5
18d	32	62,5	32	62,5	16	32	62,5	16	32	62,5
18f	62,5	125	125	125	62,5	125	250	62,5	62,5	125
18i	32	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	32	62,5	125
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

5.1.4 Antimykobakteriální hodnocení hydroxyderivátů 3-fenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu

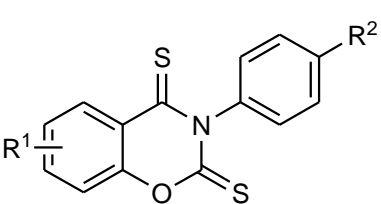


	R ¹		R ²
19	5-OH	a	H
20	7-OH	b	4-Cl
		d	4-CH ₃
		f	4-OCH ₃

Tabulka č. 13: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) hydroxyderivátů 3-fenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onu

Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
19a	125	250	125	125	62,5	125	250	62,5	125	250
19b	62,5	125	62,5	125	32	62,5	250	32	62,5	125
19d	62,5	125	62,5	125	62,5	125	250	62,5	125	250
19f	125	250	250	250	125	125	250	125	250	250
20b	16	32	16	32	62,5	62,5	125	32	62,5	62,5
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

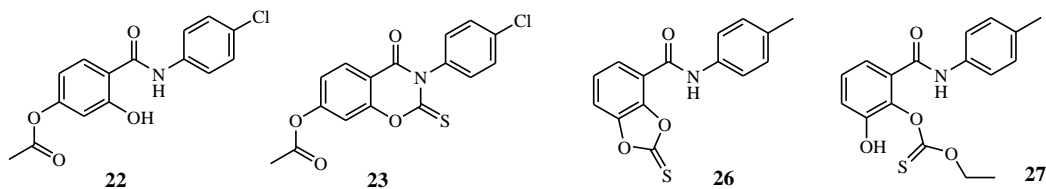
5.1.5 Antimykobakteriální hodnocení 3-fenyl-5-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

	R ¹		R ²		
	21	5-OH	a	H	
				b	4-Cl
				d	4-CH ₃
				f	4-OCH ₃

Tabulka č. 14: Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů

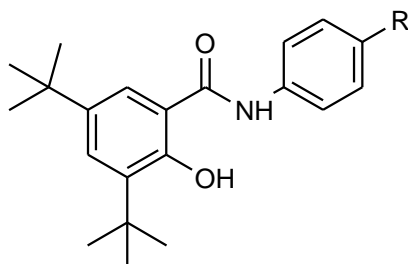
Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
21a	32	62,5	62	62,5	32	62,5	125	32	62,5	125
21b	32	62,5	32	62,5	32	62,5	125	32	62,5	125
21d	62,5	62,5	125	125	32	32	62,5	62,5	62,5	62,5
21f	125	125	125	125	62,5	125	125	62,5	125	125
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

5.1.6 Antimykobakteriální hodnocení vybraných látek připravovaných cyklizačními reakcemi (viz kapitola 4.4.2)

**Tabulka č. 15:** Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)

Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
22	32	62,5	62,5	125	62,5	62,5	125	32	125	250
23	32	62,5	32	62,5	32	62,5	62,5	32	62,5	125
26	250	500	500	500	250	500	500	250	500	500
27	250	500	500	500	250	500	500	250	500	500
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

5.1.7 Antimykobakteriální hodnocení 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů

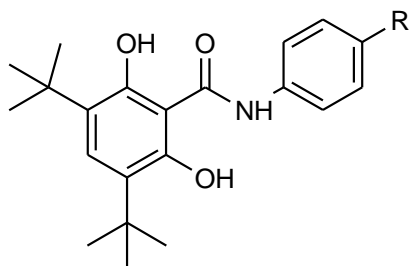


29	R
a	H
b	4-Cl
d	4-CH ₃
f	4-OCH ₃

Tabulka č. 16: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů **29** a výchozí kyseliny **28** a vedlejší látky **30**

Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
28	62.5	125	500	500	62.5	125	125	32	62.5	62.5
29a	32	62.5	125	125	4	8	8	2	4	4
29b	8	16	62.5	62.5	8	16	16	4	4	8
29d	8	16	62.5	62.5	8	8	8	4	8	8
29f	62.5	125	62.5	62.5	4	4	4	8	8	8
30	62.5	62.5	32	62.5	8	16	32	4	8	32
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

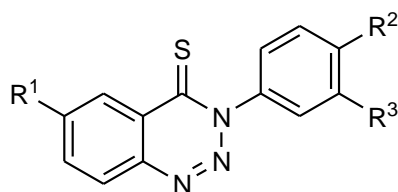
5.1.8 Antimykobakteriální hodnocení 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů



35	R
a	H
b	4-Cl
d	4-CH ₃
f	4-OCH ₃

Tabulka č. 17: Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů **35** a výchozích látek **31 - 32, 34**

Látka	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. kansasii</i>			<i>M. kansasii</i>		
	My 331/88		My 330/88		My 235/80			6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
31	250	500	1000	1000	125	500	1000	250	500	500
32	125	250	250	250	62.5	250	500	62.5	125	500
34	125	125	250	500	62.5	62.5	62.5	125	125	125
35a	4	8	125	250	1	1	1	1	2	2
35b	2	2	250	500	1	1	1	1	1	2
35d	8	8	62.5	125	1	1	2	1	1	1
35f	16	16	62.5	125	1	1	2	1	1	1
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

5.1.9 Antimykobakteriální hodnocení 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionů**Tabulka č. 18:** Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionů

Látka	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. kansasii</i>			<i>M. kansasii</i>		
	My 331/88		My 330/88		My 235/80			6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
36	125	250	62.5	62.5	32	62.5	62.5	62.5	125	250
37	125	125	62.5	62.5	62.5	125	125	62.5	125	125
38	32.5	125	62.5	62.5	62.5	125	250	62.5	125	250
39	32.5	125	125	125	62.5	125	250	62.5	125	125
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

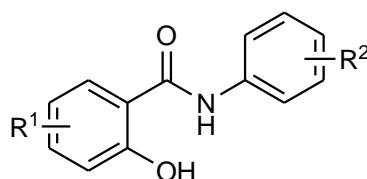
Tabulka č. 18: pokračování

Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
40	32.5	125	62.5	62.5	62.5	125	250	62.5	125	250
41	32.5	125	62.5	62.5	62.5	125	250	62.5	125	250
42	32.5	125	62.5	62.5	32	62.5	62.5	32	62.5	62.5
43	62.5	62.5	31.5	31.5	31.5	31.5	31.5	15.6	31.2	31.2
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

5.2 Antifungální aktivita

Antifungální hodnocení bylo provedeno na katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Antimykotická aktivita¹⁹⁷ *in vitro* byla testována proti 8 druhům hub potenciálně patogenních pro člověka: *Candida albicans* (ATCC 44859), *Candida tropicalis* (156), *Candida krusei* (E28), *Candida glabrata* (20/I), *Trichosporon asahii* (1188), *Aspergillus fumigatus* (231), *Absidia corymbifera* (272), *Trichophyton mentagrophytes* (445). Testování *in vitro* bylo prováděno mikrodiluční bujonovou metodou¹⁹⁷ v destičkách M27A-M1, jako živné medium bylo použito RPMI 1640 s glutaminem, pH = 7, MOPS (0.165M). Doba inkubace byla 24-48 hodin (u *T. mentagrophytes* 48-72 hodin) při teplotě 35°C. Odečítání bylo vizuální / fotometrické (od 540 nm), MIC = IC₈₀, IC₅₀ (u vláknitých hub). Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a testovány v koncentracích 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Jako standardy byly použity flukonazol (FLU).

5.2.1 Antifungální hodnocení *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů



	R¹		R²		R²
1	3-OH	a	H	h	4-C(CH ₃) ₂
2	4-OH	b	4-Cl	i	4-[CH ₂] ₃ CH ₃
3	5-OH	c	4-F	j	4-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
4	6-OH	d	4-CH ₃	k	4-CH ₂ C ₆ H ₅ *
5	3-OCH ₃	e	3-CH ₃		
6	6-OCH ₃	f	4-OCH ₃		
7	3,4-OH	g	4-CH ₂ CH ₃		

Tabulka č. 19: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů

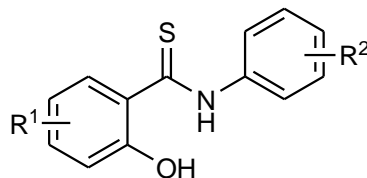
Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
1a	15,63 62,5	7,81 15,63	62,5 62,5	7,81 15,63	62,5 125	62,5 250	125 125	31,25 31,25
1b	7,81 31,25	3,91 7,81	15,63 31,25	3,91 7,81	31,25 62,5	31,25 125	62,5 31,25	7,81 15,63
1d	31,25 62,5	7,8 15,62	31,25 62,5	7,8 15,62	62,5 125	125 125	62,5 62,5	31,25 31,25
1f	31,25 62,5	62,5 62,5	31,25 62,5	62,5 62,5	31,25 62,5	62,5 250	15,62 15,62	31,25 31,25
1g	31,25 31,25	62,5 62,5	15,62 15,62	7,8 15,62	31,25 62,5	31,25 62,5	31,25 31,25	15,62 15,62
1h	7,8 15,62	62,5 62,5	15,62 15,62	7,8 15,62	31,25 62,5	62,5 125	15,62 15,62	7,8 15,62
2a	125 250	>500 >500	>500 >500	>500 >500	62,5 62,5	>500 >500	>500 >500	500 500
2b	62,5 125	250 250	250 250	250 250	250 250	125 250	250 250	31,25 62,5
2d	125 500	500 >500	500 >500	500 500	500 500	500 500	500 500	500 500
2f	125 500	500 >500	500 >500	500 500	500 500	500 500	500 500	500 500
2h	62,5 62,5	250 250	250 250	250 250	125 250	500 500	125 250	125 250
FLU	1 2	3 5	>50 >50	22 >50	4 9	>50 >50	>50 >50	17 26

Tabulka č. 19: pokračování

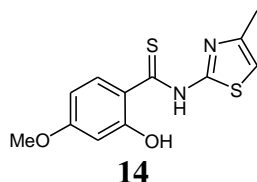
Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
3a	500	>500	>500	>500	>500	500	>500	500
	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
3b	31,25	125	125	125	250	125	125	31,25
	62,5	125	250	250	250	250	250	62,5
3d	125	250	500	250	250	250	250	125
	250	250	500	500	250	250	250	125
3f	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
3g	125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	62,5
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	62,5
4a	250	250	125	125	62,5	62,5	125	31,25
	250	250	250	250	250	250	250	31,25
4b	3,91	15,63	7,81	15,63	7,81	15,63	15,63	1,95
	7,81	31,25	7,81	31,25	15,63	31,25	31,25	1,95
4c	125	125	62,5	62,5	62,5	31,25	125	15,62
	125	125	62,5	125	62,5	62,5	125	15,62
4d	15,63	62,5	31,25	62,5	31,25	31,25	62,5	7,81
	31,25	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	15,63
4e	125	125	62,5	125	62,5	62,5	125	7,8
	125	250	62,5	125	125	62,5	125	7,8
4f	125	250	125	250	125	125	125	125
	125	500	250	250	250	250	125	125
4i	31,25	62,5	31,25	62,5	62,5	31,25	15,62	1,95
	62,5	125	125	>125	>125	62,5	15,62	15,62
4k	500	500	500	500	500	500	250	62,5
	500	500	500	500	500	500	250	125
5d	62,5	250	500	500	250	250	62,5	62,5
	125	500	500	500	500	500	125	125
6d	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
7b	31,24	7,81	31,25	7,81	62,5	125	31,25	15,63
	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	250	62,5	31,25
7d	15,63	7,81	31,25	3,91	62,5	62,5	31,25	15,63
	62,5	31,25	31,25	31,25	62,5	250	62,5	31,25
FLU	1	3	>50	22	4	>50	>50	17
	2	5	>50	>50	9	>50	>50	26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

5.2.2 Antifungální hodnocení *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidů



	R¹		R²		R²
8	3-OH	a	H	g	4-CH ₂ CH ₃
9	4-OH	b	4-Cl	h	4-C(CH ₃) ₂
10	5-OH	c	4-F	i	4-[CH ₂] ₃ CH ₃
11	6-OH	d	4-CH ₃	j	4-CH ₂ CH(CH ₃) ₂
12	3-OCH ₃	e	3-CH ₃	k	4-CH ₂ C ₆ H ₅ *
13	6-OCH ₃	f	4-OCH ₃		



* Substituent na *N* místo fenylu

Tabulka č. 20: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) *N*-fenyl-dihydroxythio-benzamidů

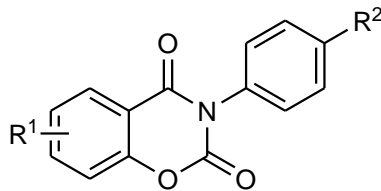
Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
8a	62,5	7,8	125	7,8	62,5	125	15,62	62,5
	62,5	15,62	62,5	15,62	125	125	16,62	62,5
8b	15,62	3,9	15,62	3,9	31,25	62,5	7,8	15,62
	31,25	7,8	31,25	7,8	31,25	62,5	7,8	15,62
8c	62,5	125	31,25	15,62	62,5	62,5	15,62	62,5
	62,5	125	62,5	15,62	62,5	125	15,62	62,5
8d	15,62	3,9	15,62	7,8	31,25	62,5	7,8	15,62
	31,25	7,8	31,25	7,8	62,5	62,5	7,8	15,62
FLU	1	3	>50	22	4	>50	>50	17
	2	5	>50	>50	9	>50	>50	26

Tabulka č. 20: pokračování

Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
8g	15,62	31,25	15,62	7,8	15,62	31,25	7,8	15,62
	15,62	62,5	15,62	15,62	31,25	62,5	7,8	15,62
8j	7,8	15,62	7,8	7,8	15,62	31,25	15,62	15,62
	15,62	15,62	15,62	7,8	15,62	31,25	15,62	15,62
9b	62,5	250	250	250	250	250	125	62,5
	62,5	500	250	250	250	250	125	62,5
9d	250	250	500	500	250	500	125	125
	250	500	>500	500	500	>500	125	125
9h	62,5	125	>125	>125	>125	>125	62,5	31,25
	125	>125	>125	>125	>125	>125	62,5	31,25
10a	125	500	250	250	250	250	250	125
	250	>500	500	500	500	500	250	125
10b	125	125	250	125	250	125	250	62,5
	125	125	250	125	250	250	250	62,5
10g	62,5	125	250	250	125	250	62,5	31,25
	125	250	250	250	250	500	62,5	62,5
11a	125	125	500	250	250	500	250	62,5
	250	250	250	250	500	500	250	62,5
11b	62,5	125	62,5	125	62,5	125	62,5	15,6
	62,5	125	125	125	62,5	125	62,5	15,6
11e	125	250	250	250	125	125	125	125
	250	500	250	500	250	500	125	125
11i	31,25	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	15,62	31,25
	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	250	15,62	31,25
11k	500	>500	500	500	125	125	250	31,25
	500	>500	500	>500	250	250	250	31,25
12d	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	15,62
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	15,62
13d	250	>500	>500	500	500	>500	250	250
	500	>500	>500	>500	>500	>500	250	250
14	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FLU	1	3	>50	22	4	>50	>50	17
	2	5	>50	>50	9	>50	>50	26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

5.2.3 Antifungální hodnocení 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

	R ¹		R ²
15	8-OH	a	H
16	7-OH	b	4-Cl
17	6-OH	d	4-CH ₃
18	5-OH	f	4-OCH ₃
		i	4-[CH ₂] ₃ CH ₃

Tabulka č. 21: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

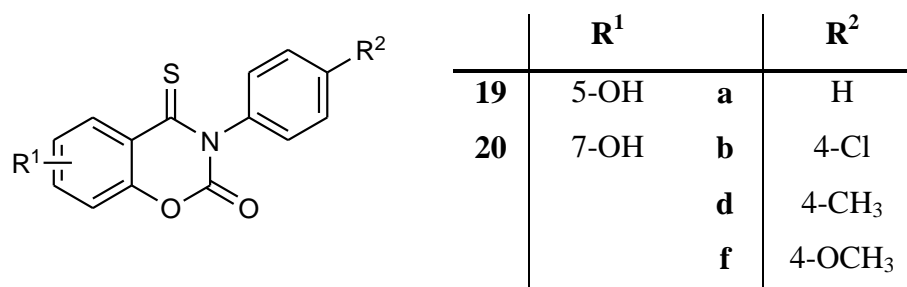
Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
15a	125	250	250	62,5	250	250	250	125
	250	250	250	62,5	250	500	250	125
15b	15,62	31,25	31,25	3,9	31,25	62,5	15,62	62,5
	31,25	62,5	31,25	3,9	62,5	125	31,25	62,5
15d	125	125	125	15,62	62,5	125	125	31,25
	125	250	125	31,25	125	250	125	31,25
15f	125	250	125	31,25	250	250	250	250
	125	250	125	31,25	250	500	250	250
16a	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500
16b	500	>500	>500	>500	>500	>500	500	125
	500	>500	>500	>500	>500	>500	500	250
16d	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
16f	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
17a	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
17b	250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125
	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125
17d	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
17f	250	250	250	250	250	>500	>500	250
	250	250	250	250	250	>500	>500	500
FLU	1	3	>50	22	4	>50	>50	17
	2	5	>50	>50	9	>50	>50	26

Tabulka č. 21: pokračování

Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
18a	125	250	250	500	125	125	250	31,25
	250	500	250	500	125	250	250	31,25
18b	125	>125	>125	>125	7,81	>125	>125	7,81
	>125	>125	>125	>125	15,63	>125	>125	7,81
18d	125	125	125	250	62,5	62,5	125	31,25
	125	125	125	250	125	125	125	31,25
18f	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
18i	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
FLU	1	3	>50	22	4	>50	>50	17
	2	5	>50	>50	9	>50	>50	26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

5.2.4 Antifungální hodnocení 3-fenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onů



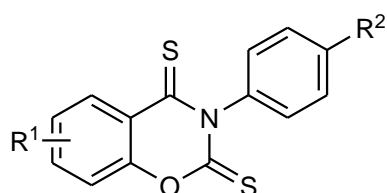
Tabulka č. 22: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) 3-fenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-onů

Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
19a	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
19b	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125

19d	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
19f	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
20	500	500	500	500	500	500	250	62.5
	500	500	>500	500	>500	>500	250	125
FLU	1	3	>50	22	4	>50	>50	17
	2	5	>50	>50	9	>50	>50	26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

5.2.5 Antifungální hodnocení 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů



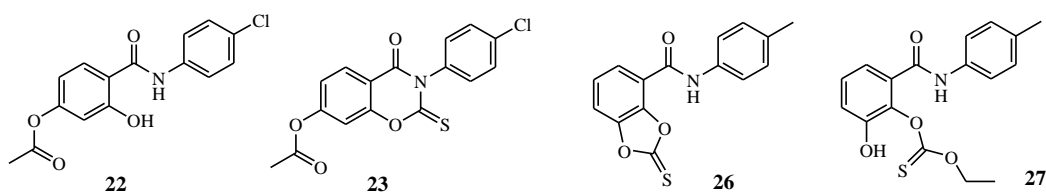
	R¹		R²
21	5-OH	a	H
		b	4-Cl
		d	4-CH ₃
		f	4-OCH ₃

Tabulka č. 23: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů

Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
21a	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
21b	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	15,62
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	31,25
21d	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
21f	250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
FLU	1	3	>50	22	4	>50	>50	17
	2	5	>50	>50	9	>50	>50	26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

5.2.6 Antifungální hodnocení vybraných látek připravovaných cyklizačními reakcemi (viz kapitola 4.4.2).

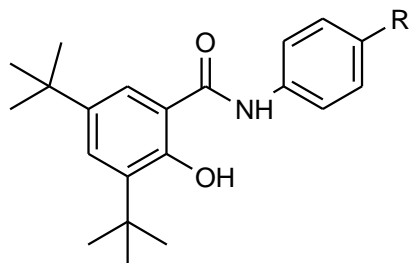


Tabulka č. 24: Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) látek (**22**, **23**, **26**, **27**)

Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
22	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	125 125
23	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	62,5 125
26	31,25 62,5	62,5 62,5	62,5 62,5	31,25 31,25	62,5 125	125 >125	62,5 62,5	31,25 31,25
27	15,62 31,25	62,5 125	62,5 62,5	15,62 15,62	62,5 125	125 250	62,5 62,5	15,62 15,62
FLU	1 2	3 5	>50 >50	22 >50	4 9	>50 >50	>50 >50	17 26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

5.2.7 Antifungální hodnocení 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů



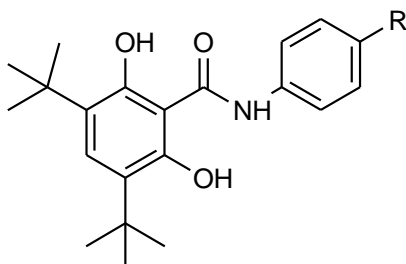
29	R
a	H
b	4-Cl
d	4-CH ₃
f	4-OCH ₃

Tabulka č. 25: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzanilidů **29** a vedlejší látky **30**

Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
29a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
29b	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
29d	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
29f	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
30	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FLU	1	3	>50	22	4	>50	>50	17
	2	5	>50	>50	9	>50	>50	26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

5.2.8 Antifungální hodnocení 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů



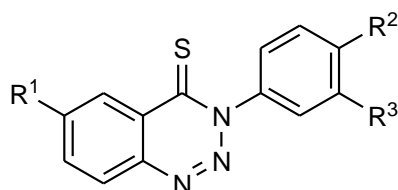
35	R
a	H
b	4-Cl
d	4-CH ₃
f	4-OCH ₃

Tabulka č. 26: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů **35** a výchozích látek **31** a **32**

Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
31	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500
32	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125
35a	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500
35b	31,25 250	>500 >500	250 >500	15,62 125	15,62 31,25	>500 >500	3,9 31,25	31,25 62,5
35d	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	250 250	>500 >500
35f	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	>500 >500	500 >500	>500 >500
FLU	1 2	3 5	>50 >50	22 >50	4 9	>50 >50	>50 >50	17 26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

5.2.9 Antifungální hodnocení 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thionů



Tabulka č. 27: Minimální inhibiční koncentrace (μmol/l) 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-thionů

Látka	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
36	62,5 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	62,5 >250
37	125 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250
38	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250
38	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250
40	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125
41	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250	>250 >250
42	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125	>125 >125
FLU	1 2	3 5	>50 >50	22 >50	4 9	>50 >50	>50 >50	17 26

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT - *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*, TM - *Trichophyton mentagrophytes*

6 Diskuse

6.1 Chemická část

N-Fenyl-dihydroxybenzamidů **1–4** byly připraveny z výchozí dihydroxybenzoové kyseliny, anilinu a PCl_3 . Reakce byla prováděna v chlorbenzenu a místo konvenčního zahřívání bylo použito mikrovlnného reaktoru^{90, 198} při výkonu 600 W (reakce str. 38). Reakce byla ukončena po 20 minutách, zatímco při zahřívání na olejové lázni probíhá reakce 2-3 hodiny⁷⁷. Výrazný vliv na izolaci a tím i na výtěžek produktů mělo provedení sloupcové chromatografie před krystalizací.

Touto metodou bylo připraveno 23 *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů **1a–4i** ve výtěžku 55-81 % a jeden *N*-benzyl-2,6-dihydroxybenzamid (**4k**) (výtěžek 76 %). Analogickou metodou byly připraveny dva methoxysalicylanilidy **5d, 6d** (55–81 %) a dva *N*-fenyl-2,3,4-trihydroxybenzamidů **7b, d** (31 a 36 %, izolace bez sloupcové chromatografie). Přehled látek viz tabulka č. 1.

N-Fenyl-dihydroxybenzamidů byly převedeny na *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidů **8–11**. Přípravou thiosalicylanilidů dvoustupňovou reakcí^{55, 56} (bez nutnosti izolace meziprojektu) se zabýval Šustr¹⁹⁹ (reakce str. 49). Tuto metodu jsem využil a optimalizoval pro přípravu svých látek.

V prvním stupni reagoval příslušný *N*-fenyl-dihydroxybenzamid (**1a–4k, 5d, 6d**) s P_4S_{10} v molárním poměru 1:1 v sušeném pyridinu (10–15 ml). Reakce byla optimalizována za použití mikrovlnného reaktoru při výkonu 500 W, čímž došlo ke zkrácení reakčního času a oproti předchozím 8 - 13 hodinám byla prováděna 1 hodinu. Reakce byla monitorována TLC, za použití mobilní fáze aceton:hexan (2:3), do vymizení výchozí látky. Vzniklý surový meziprojekt, tj. derivát pyridinium-3-fenyl-2,4-dithioxo-3,4-dihydro-1,3,2 λ^5 -benzoxafosfinin-2-thiolátu, byl poté použit do následujícího kroku bez izolace.

Ve druhém stupni byla reakční směs z prvního kroku podrobena kyselé hydrolýze (konc. HCl , $\text{pH} \approx 1-2$) ve směsi chloroformu (toluenu) a vody, kdy vznikající *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamid pronikal přes fázové rozhraní do organické fáze. Tento krok byl prováděn zahříváním po dobu 3–6 hodin pod zpětných chladičem bez použití mikrovlnného reaktoru. Reakce byla opět monitorována pomocí TLC. Organická fáze byla následně odpařena a surový žlutý krystalický produkt byl čištěn sloupcovou

chromatografií na siligagelu. Jako mobilní fáze byla použita směs aceton:hexan (1:12). Vzniklý produkt byl dočištěn krystalizací ze směsi ethanol a voda.

Použití mikrovlnného reaktoru mělo za následek pouze snížení reakčního času v daném kroku bez výrazného vlivu na výtěžek reakce, proto ve druhém kroku bylo zvoleno klasické zahřívání z důvodu nepřetěžování mikrovlnného reaktoru a přístupnějšího provádění monitoringu pomocí TLC.

Velmi se osvědčilo použití chloroformu jako rozpouštědla, které sice nemělo vliv na výtěžek reakce, ale docházelo ke zkrácení reakční doby v řádu 1–2 hodin. Použitím chloroformu, který je těžší než voda a má nižší teplotu varu, docházelo k lepšímu promíchávání reakční směsi bublinkami rozpouštědla a k lepšímu rozpouštění vznikajících *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidů oproti toluenu.

Touto metodou bylo připraveno 16 derivátů *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidu (**8a** - **11i**) (ve výtěžku 39–68 %), jeden *N*-benzyl-2,6-dihydroxybenzamid **11k** (68 %), dva methoxythiosalicylanilidy **12d** a **13d** (54, 61 %) a heterocyklický analog 2-hydroxy-4-methoxy-*N*-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)thiobenzamid (**14**) (64 %). Přehled látek viz tabulka č. 2.

Pro syntézu hydroxyderivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu **15–18** jsem použil cyklizační reakci *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů **1a–4i** s methylchlorformiátem v bezvodém pyridinu (reakce str. 58). Tímto postupem¹⁹⁸ bylo připraveno 17 bílých krystalických látek ve výtěžku 77–94 %. Přehled látek viz tabulka č. 3.

Dalším záměrem bylo převést připravené hydroxyderiváty 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu **15–18** thionací na odpovídající monosírné a disírné hydroxyderiváty, tj. 3-fenyl-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-ony a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony. Metodou přímého tavení vychází látky s P₄S₁₀ se zabýval prof. Waisser^{114, 200}. V rešeršní práci o použití Lawessonova činidla v organické syntéze není thionace podobných látek uvedena¹⁰⁹. V předběžných pokusech se nejvíce osvědčilo přímé tavení výchozí látky s Lawessonovým činidlem (reakce str. 64) při teplotě 190–200 °C po dobu 4 minut. Při použití Lawessonova činidla docházelo již při 160 °C k vytvoření homonogenní směsi a tím k dobrému promíchávání reakčních komponent. V případě P₄S₁₀ docházelo k vytvoření homonogenní směsi až kolem 200 °C a reakce probíhala asi 20 minut při teplotě 200 - 210 °C. Reakční směs byla po ochlazení rozpuštěna v chloroformu, zfiltrována a následně čištěna sloupcovou

chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze hexan:toluen. Ze směsi byl nejprve izolován disírný produkt (vyšší hodnota R_f) a poté monosírný derivát (nižší hodnota R_f).

Tímto postupem (reakce str. 64) byly připraveny 4 deriváty 3-fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-onu **19a–f** (31–42 %) a 4 deriváty 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu **21a–f** (24–33 %). Pokusy o přípravu monosírných a disírných derivátů s hydroxyskupinou v polohách 6, 7 nebo 8 vedly ke směsi velké řady dále obtížně izolovatelných a neidentifikovaných látek. Reakce byly prováděny za různých podmínek, tzn. měnila se teplota, čas nebo thionační činidlo (P_4S_{10} namísto Lawessonova činidla). Reakce byla prováděna i zahříváním v rozpouštědle (DMF, pyridin). Jako výchozí látka byla zkoušena i monoacetylovaný derivát, avšak bez pozitivního výsledku. Pouze v případě jednoho derivátu s hydroxyskupinou v poloze 7 se podařilo izolovat odpovídající 3-(4-chlorfenyl)-7-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-on (**20b**), a to ve výtěžku 5 % původním způsobem (viz schéma č. 1). Přehled látek viz tabulka č. 4 a 5.

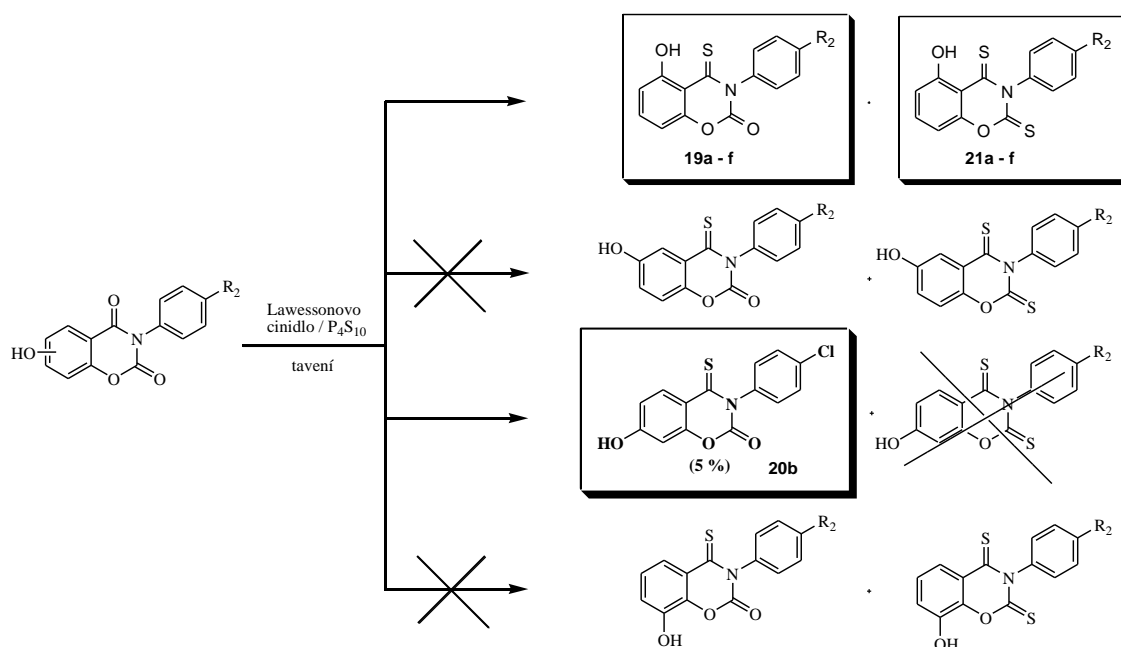
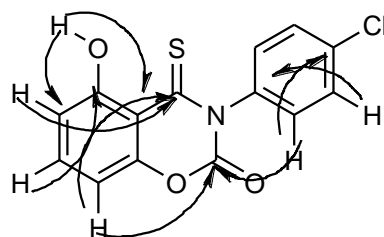


Schéma č. 1

To, že u monosírných derivátů (**19**, **20b**) je thioxoskupina v poloze 4, bylo potvrzeno 2D NMR (gHMQC a gHSCQ) experimenty, které byly provedeny u látky **19b**. Všechny gHSQC korelace jsou znázorněny na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: gHSCQ korelační příspěvky

Jelikož se metoda přímého tavení neukázala jako obecně použitelná (viz schéma č. 1), pokusil jsem se o přípravu u několika málo vybraných sirných analogů jinými postupy (viz schéma č. 2).

Zvolil jsem si deriváty s hydroxyskupinou v poloze 7 (viz schéma č. 2) a znovu jsem připravil 3-(4-chlorfenyl)-7-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-on (**20b**), a to cyklizací výchozího *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxythiobenzamidu (**9b**) s methyl-chlorformiátem (reakce str. 68). Tímto postupem bylo dosaženo 76% výtěžku, oproti 5% výtěžku metodou přímého tavení výchozích komponent.

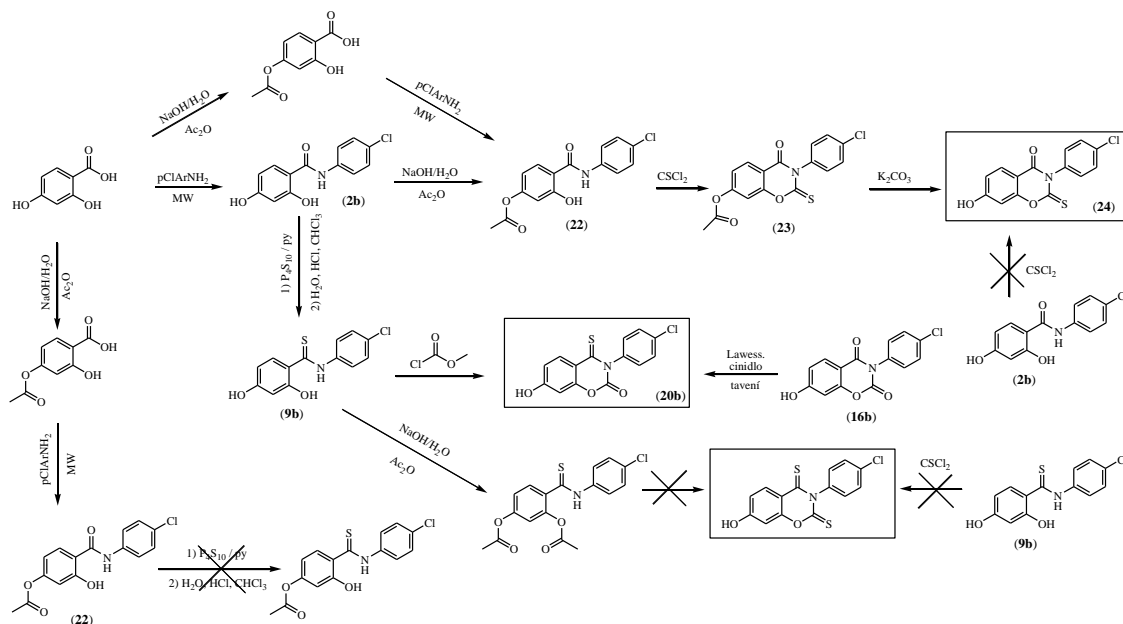


Schéma č. 2

Reakce *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxybenzamidu (**2b**) s thiofosgenem nevedla k žádanému produktu **24**, jelikož pravděpodobně docházelo k polymerizaci. Proto jsem přistoupil k chránění hydroxyskupiny v poloze 4 acylu.

Nejprve byl dvěma způsoby (reakce str. 69) připraven 4-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetát (**22**). První spočíval v přípravě 4-acetoxy-2-hydroxybenzoové kyseliny, tj. v selektivním chránění hydroxyskupiny v poloze 4, reakcí s NaOH a acetanhydridem.²⁰¹ Následovala reakce s 4-chloranilinem za vzniku 4-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetátu (**22**). Použil jsem již osvědčený způsob přípravy v mikrovlnném reaktoru (viz kapitola 4.1). Tímto krokem byl připraven potřebný meziprodukt **22** ve výtěžku 51 %. Druhý způsob spočíval v acetylaci již připraveného *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxybenzamidu (**2b**), analogickou reakcí, tj. s NaOH a acetanhydridem, s výtěžkem 74 %. Tímto postupem byl připraven meziprodukt **22** ve výtěžku 74 %. V porovnání výtěžnosti obou dvoustupňových přístupů měl první celkový výtěžek 34 % a druhý 40 %.

V dalším stupni následovala cyklizace 4-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetátu (**22**) s thiofosgenem (reakce str. 70). Reakce byla prováděna v bezvodém chloroformu za použití báze triethylaminu. Touto reakcí byl připraven 3-(4-chlorfenyl)-4-oxo-2-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-benzoxazin-7-yl-acetát (**23**) ve výtěžku 62 %. Poslední krok syntézy spočíval v hydrolýze acetylu z aromatické části molekuly, bez porušení heterocyklického kruhu. K tomu byla upravena metoda²⁰². Jednalo se o rozpuštění látky v minimálním množství tetrahydrofuranu a následná hydrolýza byla provedena pomocí K₂CO₃ a methanolu (reakce str. 71). Tímto postupem byl získán finální produkt, tj. 3-(4-chlorfenyl)-7-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-benzoxazin-4-on (**24**) ve výtěžku 72 %.

Posledním zástupcem derivátů, obsahujících hydroxyskupinu v poloze 7, je disirný analog, 3-(4-chlorfenyl)-7-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion (viz schéma č. 2). K jeho přípravě nevedla opět přímá reakce *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxythiobenzamidu (**9b**) s thiofosgenem. Metoda thionace 4-[(4-chlorfenyl)karbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetátu (**22**) za vzniku 4-[(4-chlorfenyl)thiokarbamoyl]-3-hydroxyfenyl-acetátu pomocí metody popsané v kapitole 4.2 nevedla k jednotnému produktu, ale ke směsi více produktů s hlavním podílem deacetylovaného. Proto jsem chtěl provést chránění hydroxyskupiny v poloze 4 acylem *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxythiobenzamidu (**9b**). K acetylaci látky **9b** byla použita metoda

využívající NaOH a acetanhydridu, která byla popsána výše, a byla získána pouze jedna látka ve výtěžku 57 %. Podle NMR spektra látka obsahuje 2 acetylové skupiny v acylové části, proto nebylo možné provést cyklizaci pomocí thiofosgenu.

Dále jsem se pokusil o přípravu 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-1,3-benzoxazin-4-onu (reakce str. 72), izomeru látky **19b**, lišícího se polohou oxo- a thioxoskupiny. Pro přípravu byla zvolena metoda cyklizace *N*-(4-chlorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (**4b**) s thiofosgenem, triethylaminem v bezvodém chloroformu. Reakce byla provedena analogicky jako v případě látky **23** a po reakci byla izolována žlutá krystalická látka ve výtěžku 51 %. Podle ¹³C-NMR, teploty tání a IČ spektra bylo prokázáno, že se jedná o 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-4-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-benzoxazin-4-on (**19b**), tj. o derivát s thioxo skupinou v poloze 4. Reakce byla opakována v tetrahydrofuranu jako rozpouštědlo, ale se stejným výsledkem. Pro tuto cyklizaci a přemístění thioxo skupiny do polohy 4 zatím nemám uspokojivé vysvětlení. Při rešerši v chemických databázích nebyl nalezen podobný případ.

Pro kontrolu byla provedena reakce s monohydroxyderivátem, která měla vyloučit ovlivňování průběhu reakce hydroxyskupinou v poloze 6, v tzv. chelátovém uspořádání. Při reakci byl použit *N*-(4-chlorfenyl)-2-hydroxybenzamid se stejnými reakčními komponentami a podmínkami (reakce str. 72). Po reakci, která proběhla velmi hladce, byla získána bílá krystalická látka, ve výtěžku 76 %. Poloha thioxoskupiny (poloha 2 nebo 4) šla velmi snadno, kromě barvy látky, určit pomocí ¹³C-NMR. V případě thioxoskupiny v poloze 2 činil posun v ¹³C-NMR spektru $\delta \approx 181\text{--}184$ ppm, bez ohledu na rozpouštědlo, zatímco v případě thioxoskupiny v poloze 4 činil posun v ¹³C-NMR $\approx 192\text{--}193$ ppm.

Konečně při reakci fosgenu s 2,3-dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamidem (**1d**) jsem si chtěl ověřit, zda vznikne předpokládaný 5členný kruh, tj. 2-thioxo-*N*-(4-methylfenyl)-2*H*-1,3-benzodioxol-4-karboxamid (**26**), nebo méně pravděpodobný 6členný kruh, tj. 8-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2-thioxo-2,3-dihydro-4*H*-benzoxazin-4-on (reakce str. 73). Po reakci byla izolována jediná látka, která byla následně určena jako očekávaný 2-thioxo-*N*-(4-methylfenyl)-2*H*-1,3-benzodioxol-4-karboxamid (**26**). Při rekrystalizaci produktu z ethanolu došlo k jeho kvantitativní přeměně, která byla způsobena otevřením 5členného kruhu nukleofilním atakem ethanolu za vzniku *O*-ethyl-*O'*-(2-hydroxy-6-[(4-methylfenyl)karbamoyl]fenyl)-karbonothioátu (**27**). Poloha ethoxythiokarbonylové

skupiny byla určena na základě prostorové blízkosti v NOE 2D NMR experimentu. Výtěžek produktu **26** činil 62 % a ethanolem otevřeného produktu **27** činil 69 %.

Pro přípravu 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů **29a-f** a 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzadů **35a-f** jsem zvolil cestu převedení výchozí substituované karboxylové kyseliny, na odpovídající *N*-fenylbenzamid metodou popsanou v kapitole (4.1) za využití mikrovlnného reaktoru.

Pro přípravu 3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoové kyseliny (**28**) jsem použil metodu, která vycházela z klasické Friedelovy-Craftsovy alkylace¹⁹¹. Při syntéze jsem vyšel z methyl-salicylátu, *terc*-butanolu a konc. H₂SO₄ jako katalyzátoru (reakce str. 74). Podle orientace aktivující skupiny byly *terc*-butylové skupiny navázány do poloh *ortho* a *para* vzhledem k hydroxyly, tj. do poloh 3 a 5 vzhledem k methoxykarbonylu. V prvním kroku byl izolován methylester odpovídající kyseliny (79 %), který následnou bazickou hydrolýzou s KOH poskytl 3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoovou kyselinu (**28**) ve výtěžku 75 %.

K přípravě 3,5-di-*terc*-butyl-2,6-dihydroxybenzoové kyseliny (**34**) jsem nejprve připravili výchozí methyl-2,6-dihydroxykarboxylát (**31**) a potom jsem aplikoval výše popsany postup. Alkylace probíhala mnohem snadněji a byla ukončena již za 3 hodiny za míchání při laboratorní teplotě, na rozdíl od 15 hodin při přípravě kyseliny **28**. Výchozí methyl-2,6-dihydroxykarboxylát (**31**) byl syntetizován podle literatury¹⁹⁴, tj. esterifikací za pomoci dicyklohexylkarbodiimidu (DCC), (dimethylamino)pyridinu (DMAP) v methanolu (reakce str. 78). Výtěžek methyl-2,6-dihydroxykarboxylátu činil 49 % (lit.¹⁹⁴ 25 %). Během této reakce byl izolován meziprodukt **32** (ve výtěžku 19 %), tj. první stupeň při esterifikaci pomocí DCC, kdy dochází k aktivaci výchozí 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny. Při použití diisopropylkarbodiimidu (DII) místo DCC byl izolován methyl-2,6-dihydroxykarboxylát (**31**) ve výtěžku 59 %. Přehled látek viz tabulka č. 7.

Z 3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxybenzoové kyseliny (**28**) a 3,5-di-*terc*-butyl-2,6-dihydroxybenzoové kyseliny (**34**) byly připraveny odpovídající *N*-fenylbenzamidy. Byla použita metoda na přípravu *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů (kapitola 4.1) za použití mikrovlnného reaktoru (reakce str. 75 a 80). Byly připraveny čtyři 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidy **29a-f** ve výtěžku 41-65 % a čtyři 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidy **35a-f** ve výtěžku 44-53 %. Přehled látek viz tabulka č. 6 a 8. Při přípravě 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů (**29a**) byl izolován vedlejší

produkt (rovnice str. 77) 5-*tert*-butyl-2-hydroxybenzamid (**30**) ve výtěžku 17 %. Vznik tohoto produktu lze vysvětlit dealkylací *tert*-butylu z acylové části molekuly vlivem mikrovlnného ohřívání, látka **30** již byla popsána v literatuře¹⁹³.

Poslední skupinou připravených látek jsou deriváty 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionu **36–43** (reakce str. 82). Výchozí 2-amino-*N*-fenylbenzamidby byly připraveny z 2*H*-3,1-benzoxazin-2,4(1*H*)-dionů reakcí s odpovídajícím anilinem v ledové kyselině octové²⁰³. V mikrovlnném reaktoru byla provedena thionace pomocí P₄S₁₀ v pyridinu za vzniku pyridinium-2,4-dithio-3-fenyl-3,4-dihydro-1,3,2λ⁵-benzodiazafosfinin-2-thiolátu jako meziprojektu²⁰⁴. Vzniklý meziprojekt byl bez izolace ihned použit do dalšího kroku, který byl proveden také v mikrovlnném reaktoru. Jednalo se o kyselou hydrolýzu meziprojektu ve směsi organické a vodné fáze. Surový substituovaný 2-amino-*N*-fenylthiobenzamid byl podroben diazotaci a následnou spontánní intramolekulární cyklizací byly získány deriváty 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionu (**38–40**, **42–43**) ve výtěžku 41-51%²⁰⁵.

Připravil jsem 5 derivátů 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thionu a reakcí 2-amino-*N*-(3,4-dichlorfenyl)thiobenzamidu s P₄S₁₀ v pyridinu příslušnou pyridiniíovou sůl **44**. Přehled látek viz tabulka č. 9.

6.2 Mikrobiologická část

6.2.1 Antimykobakteriální hodnocení

Diskusi mikrobiologických dat začneme hodnocením antimykobakteriální aktivity připravených látek. Je třeba předeslat, že návrh strukturních obměn, tj. zavádění druhé hydroxyskupiny do poloh 3, 4, 5 a 6 v acylové části molekuly (thio)salicylanilidu, popř. do odpovídajících poloh 8, 7, 6 a 5 v 1,3-benzoxazinovém cyklu, nevycházel primárně ze záměru připravit látky se zvýšenou antimykobakteriální aktivitou. Testování *in vitro* bylo provedeno na třech sbírkových kmenech (CNCTC) *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88, *M. avium* My 330/88, *M. kansasii* My 235/80 a na kmeni *M. kansasii* 6509/96 izolovaném z klinického vzorku od pacienta. Jako standardu bylo užito isoniazidu (INH).

Výsledky hodnocení *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů **1–4** jsou uvedeny v tabulce č. 10. Nejvyšší aktivitu proti *M. tuberculosis* z testovaných látek vykazaly 2,4-dihydroxybenzanilidy **2b** a **2h** (MIC = 16 $\mu\text{mol/l}$), látky se střední aktivitou (MIC = 32 $\mu\text{mol/l}$) lze najít i mezi 2,5-dihydroxy- a 2,6-dihydroxyanalogy (látky **3g** a **4i** s alkylem v poloze 4 anilinové části). Proti sbírkovým kmenům *M. avium* a *M. kansasii* necitlivým na isoniazid vykazovaly některé 2,4- a 2,6-dihydroxyderiváty jen o málo horší aktivitu: MIC = 62,5 $\mu\text{mol/l}$ byla zjištěna u látek **2d**, **2h** a **4b**, **4d** pro *M. avium* a u látek **2h**, **4a**, **4b**, **4d**, **4i** a **4k** pro *M. kansasii*. Nejvyšší aktivitu vůči klinickému izolátu *M. kansasii* měl *N*-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (**2b**) (MIC = 16 $\mu\text{mol/l}$), který je tak celkově neaktivnější testovanou látkou této skupiny. Naopak, 2,3-dihydroxy- a 2,3,4-trihydroxybenzanilidy **1a–h** a **7b,d** nebyly antimykobakteriálně aktivní.

Za zmínku stojí, že 6-methoxy-4'-methylsalicylanilid (**6d**) měl stejnou (nebo lepší) aktivitu vůči *M. avium* jako odpovídající 2,6-dihydroxyanalog **4d**. (Izomerní 3-methoxy-4'-methylsalicylanilid (**5d**) nebyl testován.)

Náhrada kyslíku v amidové skupině za síru thioamidové skupiny bývá zpravidla provázena zvýšením antimykobakteriální aktivity^{52, 114}. Z testovaných látek to nejlépe potvrzuje 6-methoxy-4'-methylthiosalicylanilid (**13d**), pokud jde o aktivitu vůči *M. tuberculosis* a klinickému izolátu *M. kansasii*, ale proti *M. avium* se jeho aktivita ve srovnání s amidem **6d** nezvýšila. Vyšší aktivita proti *M. tuberculosis* byla zjištěna u 3-methoxy-4'-methylthiosalicylanilidu (**12d**), s hodnotou MIC = 4 $\mu\text{mol/l}$ je druhou nejúčinnější látkou proti *M. tuberculosis* připravenou v této studii. Jistý růst aktivity lze

zaznamenat také u 2-hydroxy-4-methoxy-*N*-(4-methyl-1,3-thiazol-4-yl)thiobenzamidu **14**, pro odpovídající amid byly publikovány hodnoty MIC o jedno ředění vyšší²⁰⁶.

Pokud se jedná o *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidy **8–11** (viz tabulka č. 11), potvrzuje se takový závěr pouze částečně. Jistý růst antimykobakteriální aktivity nastal u některých 2,3-dihydroxyderivátů **8**, naopak určitý pokles aktivity nastal u některých 2,6-dihydroxyderivátů **11** a jen tři testované 2,5-dihydroxyderiváty **10** neumožňují učinit jasný závěr. U tří 2,4-dihydroxyderivátů **9** pozorujeme trend k růstu aktivity proti *M. avium*, naopak k poklesu aktivity proti *M. tuberculosis* a pro klinický izolát *M. kansasii* obojí. Nejaktivnějším testovaným *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidem je sice 2,4-dihydroxyderivát **9h**, avšak při srovnání s odpovídajícím amidem **2h** má vyšší aktivitu jen pro *M. avium* (MIC = 16 µmol/l), zatímco pro zbylé kmeny jsou aktivity nižší.

Substituované 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony **15–18** (viz tabulka č.12) připravené cyklizací si aktivitu výchozích *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidů buď zachovaly, nebo došlo k jejímu mírnému poklesu. To se vztahuje zejména na oba kmeny *M. kansasii*. Naopak relativní růst aktivity proti *M. tuberculosis* vykázaly 8-hydroxyderiváty **15** a 6-hydroxyderiváty **17** a proti *M. avium* 5-hydroxyderiváty (látky **18b** MIC = 32 µmol/l). Nejvyšší aktivitu, s hodnotou MIC = 16 µmol/l, má 7-hydroxyderivát **16d** vůči *M. tuberculosis* (u dalších 7-hydroxyderivátů **16** nastal pokles aktivity ve srovnání s odpovídajícími *N*-fenyl-2,4-dihydroxybenzamidem **2**), střední aktivitu mají látky **16b** a **18b** (MIC = 32 µmol/l).

Pokud jde o posouzení vlivu záměny jedné (v poloze 4) nebo obou oxoskupin 1,3-benzoxazin-2,4-dionu za thioxoskupinu, máme mikrobiologická data pro 5-hydroxyderiváty **19** a 7-hydroxyanalog **20b**. Nahrazení oxoskupiny za thioxo skupinu v poloze 4 se projevilo u 3-fenyl-4-thioxo-5-hydroxy-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-onů **19a-f** na antimykobakteriální aktivitě nepříznivě (viz tabulka č. 13). U 7-hydroxyanalogu **20b** však aktivita zůstala zachována, zejména proti *M. tuberculosis* (MIC = 32 µmol/l), a proti *M. avium* došlo k jejímu růstu (MIC = 32 µmol/l). Náhrada druhé oxoskupiny za thioxoskupinu u derivátů 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu (**21a-f**) (viz tabulka č. 14) tento pokles spíše kompenzovala na úroveň aktivit dionů **18** s výjimkou derivátu **21b**, u něhož nastal pokles aktivit ve srovnání s derivátem **18b**.

Významný vliv na zvýšení antimykobakteriální aktivity oproti předchozím látkám mělo zavedení dvou *terc*-butylových skupin do acylové části salicylanilidu nebo 2,6-

dihydroxybenzanilidu. Deriváty 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidů (**29a–f**) byly účinné zejména proti oběma kmenům *M. kansasii*. Proti sbírkovému kmeni necitlivému na isoniazid vykazoval nejvyšší aktivitu 3-(4-methoxyfenyl)derivát **29f** (MIC = 4 $\mu\text{mol/l}$) a proti klinickému izolátu *M. kansasii* měl nejvyšší aktivitu nesubstituovaný derivát **29a** a vyrovnal se tak isoniazidu (MIC = 4 $\mu\text{mol/l}$). O něco nižší aktivitu proti klinickému izolátu *M. kansasii* měly další dva deriváty, **29b** a **29f** (MIC = 8 $\mu\text{mol/l}$), které vykazovaly také střední aktivitu vůči *M. tuberculosis* (MIC = 16 $\mu\text{mol/l}$). Oktábec²⁰⁷ syntetizoval 2-hydroxy-3,5-di-*terc*-butylanilidy kyseliny benzoové, 4-chlorsalicylové a 5-chlorsalicylové. Zatímco benzanilid, izomer naší látky **29a** (její obrácený amid), byl prakticky neúčinný, oba chlorované salicylanilidy vykazovaly MIC = 4–8 $\mu\text{mol/l}$ proti testovaným kmenům s výjimkou *M. avium*, tzn. že její aktivita byla vyšší proti *M. tuberculosis* a proti oběma kmenům *M. kansasii* byla srovnatelná s aktivitou 3,5-di-*terc*-butylsalicylanilidů **29**.

Derivát obsahující jen jednu *terc*-butylovou skupinou v molekule, 5-*terc*-butyl-2-hydroxy-*N*-fenylbenzamid (**30**), měl nižší aktivitu (viz tabulka č. 16).

U látek se dvěma hydroxyskupinami v acylové části molekuly, tj. u derivátů 3,5-di-*terc*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů **35a–f**, byla antimykobakteriální aktivita ještě vystupňována, s hodnotami MIC \approx 1–2 $\mu\text{mol/l}$ proti oběma kmenům *M. kansasii* a tím předčily standard isoniazid. 3-(4-Chlorfenyl)derivát **35b** měl proti *M. tuberculosis* MIC = 2 $\mu\text{mol/l}$ a byl v této skupině proti tomuto kmeni nejúčinnější. Avšak proti *M. avium* zůstaly i tyto dihydroxyderiváty neaktivní. (viz tabulka č. 17)

3-Fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thiony **36–42** vykazovaly nízkou antimykobakteriální aktivitu s výjimkou derivátu disubstituovaného chlorem **42** s MIC = 32 $\mu\text{mol/l}$ proti atypickým kmenům. (viz tabulka č. 18).

6.2.2 Antifungální hodnocení

Hodnocené látky byly syntetizovány jako látky s potenciálním antifungálním účinkem, v případě *N*-fenyl-2,4-dihydroxythiobenzamidů již v literatuře dostatečně doloženým^{57–59}. Antifungální hodnocení bylo provedeno *in vitro* proti 8 druhům hub potenciálně patogenních pro člověka: *Candida albicans* (ATCC 44859), *Candida tropicalis* (156), *Candida krusei* (E28), *Candida glabrata* (20/I), *Trichosporon asahii* (1188), *Aspergillus fumigatus* (231), *Absidia corymbifera* (272) a *Trichophyton mentagrophytes* (445).

Z porovnání antifungální aktivity *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů **1–4** (viz tabulka č. 19) vzhledem k poloze hydroxyskupin v acylové části molekuly vyplývá, že významnější aktivitu vykazují deriváty *N*-fenyl-2,3-dihydroxybenzamidy **1**, *N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidu **4** a 2,3,4-trihydroxy-*N*-fenyl-benzamidu **7**. Nejúčinnější látkou je 2,6-dihydroxyderivát **4b**, který má z testovaných látek nejvyšší aktivitu proti kvasinkám *C. albicans* a *C. krusei* (obě MIC = 7,81 $\mu\text{mol/l}$, proti *C. krusei* je účinnější než flukonazol), *T. asahii* (MIC = 15,6 $\mu\text{mol/l}$), *A. fumigatus* (MIC = 31,2 $\mu\text{mol/l}$ a je účinnější než flukonazol). Proti *T. mentagrophytes* má nejnižší MIC = 1,95 $\mu\text{mol/l}$ a je účinnější než flukonazol (MIC = 26 $\mu\text{mol/l}$). 2,3-Dihydroxyderivát **1b** je nejaktivnější látkou proti kvasinkám *C. tropicalis* a *C. glabrata* (obě MIC = 7,81 $\mu\text{mol/l}$). Nejúčinnějšími látkami proti *A. corymbifera* jsou 2,3-dihydroxyderiváty **1f** a **1h** (MIC = 15,62 $\mu\text{mol/l}$). Za povšimnutí stojí, že látky **1b** a **4b** jsou substituovány chlorem v poloze 4 anilinové části molekuly. Látky **5d** a **6d**, u nichž byla druhá hydroxyskupina nahrazena methoxyskupinou, prakticky ztratily antifungální aktivitu.

Náhrzení kyslíku v amidové skupině za síru thioamidové skupiny se na antifungální aktivitě *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidy **8–11** projevilo různým způsobem (viz tabulka č. 20). U 2,3-dihydroxyderivátů **8** zůstala jejich aktivita zachována nebo došlo k jejímu růstu. Např. látky **8b** a **8d** mají MIC = 7,8 $\mu\text{mol/l}$ pro *C. tropicalis* a *C. glabrata* i *A. corymbifera*. Podobně se jeví i 2,4-dihydroxy- a 2,5-dihydroxyderiváty **9** a **10**, avšak případný růst aktivity nevede k významným hodnotám MIC. V případě 2,6-dihydroxyderivátů **11** došlo spíše k poklesu aktivity, což je obzvlášť patrné ze srovnání aktivit látky **11b** a odpovídající látky **4b**, která byla nejaktivnějším *N*-fenyl-dihydroxybenzamidem. Prakticky neúčinné jsou oba methoxyderiváty **12d** a **13d** a heterocyklický analog **14**.

Cyklizace výchozích látek **1–4** na odpovídající 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(*H*)-diony **15–18** měla za následek pokles aktivity (viz tabulka č. 21). Pouze 8-hydroxyderivát **15b** si zachoval (a zlepšil) aktivitu proti *C. glabrata* (MIC = 3,9 $\mu\text{mol/l}$, srov. **1b** MIC = 7,8 $\mu\text{mol/l}$). Podobně 5-hydroxyderivát **18b** si zachoval mírnou aktivitu proti *T. mentagrophytes* (MIC = 7,81 $\mu\text{mol/l}$, srov. **4b** MIC = 1,95 $\mu\text{mol/l}$).

Další modifikace spočívající v zavádění síry do molekuly, látky **19–21**, nevedla k antifungálně aktivním látkám. (viz tabulka č. 21 a 22). Antifungálně aktivní látky nebyly nalezeny ani mezi 3,5-di-*terc*-butyl deriváty kyseliny salicylové **29** a 2,6-

dihydroxybenzoové **35** (viz tabulka č. 24 a 25), ani mezi 3-fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thiony **36–42** (viz tabulka č. 27).

7 Závěr

V rámci disertační práce bylo připraveno 102 látek, z nichž 72 je originálních.

Při přípravě *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů bylo konvenční zahřívání nahrazeno použitím mikrovlnného reaktoru, čímž se zkrátil reakční čas. Patentovaná metoda vyvinutá v naší laboratoři na přípravu thiosalicylanilidů byla optimalizována i pro *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidy. Thionace 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů metodou přímého tavení byla úspěšná pouze v případě 5-hydroxyderivátů. 3-Fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thiony byly připraveny analogickou metodou jako *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidy.

Z výsledků hodnocení biologické aktivity vyplynuly následující závěry:

Ve skupině *N*-fenyl-dihydroxybenzamidů se z hlediska antifungální aktivity jeví jako nejaktivnější 2,3- a 2,6-dihydroxyderiváty. Z hlediska antimykobakteriální aktivity nejvyšší účinnost vykazovaly 2,4-dihydroxyderiváty.

Ve skupině *N*-fenyl-dihydroxythiobenzamidů se záměna kyslíku za síru projevila poklesem antifungální aktivity u 2,6-dihydroxyderivátů, u 2,3-dihydroxyderivátů zůstala aktivita zachována. Pokud jde o antimykobakteriální aktivitu, nevedla záměna kyslíku za síru k jejímu očekávanému zvýšení.

Cyklizace výchozích látek na odpovídající 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxaziny-2,4(3*H*)-diony měla na antimykobakteriální aktivitu rozdílný vliv v závislosti na testovaném kmeni a poloze hydroxyskupiny. V případě antifungální aktivity došlo k jejímu poklesu.

Zavedení *tert*-butylových skupin do polohy 3 a 5 acylové části molekuly mělo za následek zvýšení antimykobakteriální aktivity. Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu vykazovaly deriváty 3,5-di-*tert*-butyl-*N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů, které byly proti oběma kmenům *M. kansasii* byly účinnější než standard isoniazid. Tyto látky se jeví jako perspektivní pro další výzkum látek s potenciální antimykobakteriální aktivitou. Jejich antifungální aktivita nebyla významná.

3-Fenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-thiony nebyly antifungálně ani antimykobakteriálně účinné.

8 Seznam literatury

-
- ¹ Chander, F.; Watts, J.: Mycotic, Actinomycotic, and Algal Infections. In Kissane J (ed) *Anderson's Pathology*, 9th ed. CV Mosby, St. Louis, **1996**, 391-432
- ² Larone, D. H.: *Medically Important Fungi*. American Society for Microbiology, Washington, DC; **1993**
- ³ Rozsypal, H.: Systémová antimykotika. *Klin. Farmakol. Farm.* **2008**, 22(1), 40–44.
- ⁴ Almirante, B.; Rodríguez, D.; Park, B. J., et al.: Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain from 2002 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* **2005**; 43(4), 1829–1835.
- ⁵ Poukojen, E.; Lyytikäinen, O.; Anttila, V. J.; Ruutu, P.: Candidemia in Finland, 1995–1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, 9(8), 985–990.
- ⁶ Gavalda, J.; Len, O.; San, J. R.; et al. Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, 41(1), 52–59.
- ⁷ Hartl, J.; Doležal, M.; Miletín, M.; Opletalová, V.; Zimčík, P.: *Farmaceutická chemie IV (chemoterapeutika)*, Praha, Karolinum **2006**.
- ⁸ Cornely, O. A.; Maertens, J.; Bresnik, M.; et al.: Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clin. Infect. Dis.* **2007**, 44(10), 89–1297.
- ⁹ Kontoyiannis, D. P.; Bodey, G. P.; Mantzoros, C. S.: Fluconazole vs. amphotericin B for the management of candidaemia in adults: a meta-analysis. *Mycoses* **2001**, 44(5), 125–135.
- ¹⁰ Herbrecht, R.; Denning, D. W.; Patterson, T. F.; et al.: Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J Med.* **2002**, 347(6), 408–415.
- ¹¹ Denning, D. W.: Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **2003**, 362, 1142–1151

- ¹² Pallas, P. G.; Rotstein, C. M.; Betts, R. F.; et al.: Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, 45(7), 883–893.
- ¹³ Krause, D. S.; Reinhardt, J.; Vazquez, J. A.; et al.: Phase 2, randomized, dose-ranging study evaluating the safety and efficacy of anidulafungin in invasive candidiasis and candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother* **2004**, 48, 2021–2024.
- ¹⁴ Heresi, G. P.; Gerstmann, D. R.; Reed, M. D.; et al.: The pharmacokinetics and safety of micafungin, a novel echinocandin, in premature infants. *Pediatr. Infect. Dis. J* **2006**, 25(12), 1110–1115.
- ¹⁵ Haber, J.: Nová antimykotika – jaká jsou a co přinášejí. *Remedia* **2005**, 15 (3), 247–258.
- ¹⁶ Výskyt tuberkulózy v České republice v roce 2008, ÚZIS ČR, Aktuální informace č. 31/2009.2009-07-08. www.uzis.cz/download_file.php?file=3552 (2009-07-08)
- ¹⁷ WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, TB impact measurement policy and recommendations for how to access the epidemiological burden of TB and the impact of TB control. Stop TB policy paper; no. 2, WHO/HTM/TB/2009.416.
- ¹⁸ Kamal, A.; Azeeza, S.; Malik, S. M.; Shaik, A. A.; Rao, V. M.: Efforts towards the development of new antitubercular agents: potential for thiolactomycin based compounds. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2008**, 11(2), 56-80.
- ¹⁹ World Health Organization (2008). Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Emergency update **2008**.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547581_eng.pdf
- ²⁰ Da Silva, A. D.; De Almeida, M. V.; De Souza M. V. N.D; Couri, M. R. C. Biological activity and systematical methodologies for the preparation of fluoroquinolones, a class of potent antibacterial agents. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 21-39.
- ²¹ Brennan, P. J.; Zouny, D. B.; et al.: *Tuberculosis* **2008**, 88(2), 85-169.

- ²² Tomioka, H.; Tatano, Y.; Yasumoto, K.; Shimizu, T.: *Expert Rev. Resp. Med.* **2008**, 2(4), 455-471.
- ²³ Mitcher, L. A.; Baker, W.: Tuberculosis: A search for novel therapy starting with natural products. *Med. Res. Rev.* **1998**, 18, 363-74.
- ²⁴ Stover, C. K.; Warrener, P.; et al.: A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* **2000**, 405, 962-66.
- ²⁵ Slayden, R. A.; Lee, R. E.; Armour, J. W.; Cooper, A. M.; Orme, I. M.; Brennan, P. J.; Besra, G. S.: Antimycobacterial action of thiolactomycin: An inhibitor of fatty acid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 2813-19.
- ²⁶ Kubicova, L.; Waisser, K.: Biological activity of salicylanilides. *Česko-Slovenská Farmacie* **1992**, 41(6), 208-16.
- ²⁷ Vinšová, J.; Imramovský, A.: Salicylanilidy – stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou. *Česk. Slov. Farm.* **2004**, 53(6), 294-9.
- ²⁸ Wells, G. C.; Harman, R. R.: Two cases of photodermatitis due to tetrachlorosalicylanilide. *Proc. R. Soc. Med.* **1961**, 54(9), 819.
- ²⁹ Weinbach, E. C.; Garbus, J.: Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. *Nature* **1969**, 221(185), 1016-1018.
- ³⁰ Tollenaere, J. P.: Structure-activity relationships of three groups of uncouplers of oxidative phosphorylation: salicylanilides, 2-trifluoromethylbenzimidazoles, and phenols. *J. Med. Chem.* **1973**, 16(7), 791-796.
- ³¹ Storey, B. T; Wilson, D. F.; Bracey, A.; Rosen, S. L.; Stephenson, S.: Steric and electronic effects on the uncoupling activity of substituted 3,5-dichlorosalicylanilides. *FEBS Letters* **1975**, 49(3), 338-41.
- ³² Terada, H.: Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* **1990**, 87, 213-218.

-
- ³³ Areu, F. C.; Goulart, M. O.; Brett, A. M.: Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. *Biosens. Bioelectro* **2002**, *17*(11+12), 913-919.
- ³⁴ Zhang, X. W.; Yap, Y. L.: Old drugs as lead compounds for a new disease? Binding analysis of SARS coronavirus main proteinase with HIV, psychotic and parasite drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*(10), 2517-2521.
- ³⁵ Hlasta, D. J.; Demers, J. P.; Foleno, B. D.; Fraga-Spano, S. A.; Guan, J.; Hilliard, J. J.; Macielag, M. J.; Ohemeng, K. A.; Sheppard, C. M.; Sui, Z.; Webb, G. C.; Weidner-Wells, M. A.; Werblood, H.; Barrett, J. F.: Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: pharmacophore identification based on the screening hit closantel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*(14), 1923-1928.
- ³⁶ Ellsworth, E. L.; Olson, E. R.; Showalter, H. D. H.: Substituted salicylanilides as inhibitor of two-component regulatory système in bacteria. *Chemtracts* **1999**, *12*(9), 656-61.
- ³⁷ Macielag, M. J.; Demers, J. P.; Fraga-Spano, S. A.; Hlasta, D. J.; Johnson, S. G.; Kanojia, R. M.; Russell, R. K.; Sui, Z.; Weidner-Wells, M. A.; Werblood, H.; Foleno, B. D.; Goldschmidt, R. M.; Loeloff, M. J.; Webb, G. C.; Barrett, J. F.: Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*(16), 2939-45.
- ³⁸ Stephenson, K.; Yamaguchi, Y.; Hoch, J. A.: The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*(49), 38900-4.
- ³⁹ Barrett, J. F.; Hoch, J. A.: Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*(7), 1529-1536.
- ⁴⁰ Liechti, Ch.; Sequin, U.; Bold, G.; Furet, P.; Meyer, T.; Traxler, P.: Salicylanilides as inhibitors of the protein tyrosine kinase epidermal growth factor receptor. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*(1), 11-26.

-
- ⁴¹ Grosios, K.; Traxler, P.: Tyrosine kinase targets in drug discovery. *Drugs Futur.* **2003**, 28(7), 679-697.
- ⁴² Traxler, P.: Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures. *Expert Op. Ther. Targ.* **2003**, 7(2), 215-234.
- ⁴³ Kamath, S.; Buolamwini, J. K. Targeting EGFR and HER-2 receptor tyrosine kinases for cancer drug discovery and development. *Med. Res. Rev.* **2006**, 26(5), 569-594.
- ⁴⁴ Hudec, R.; Lakatos, B.; Kaiserova, K.; Orlicky, J.; Varecka, L.: Properties of the basal calcium influx in human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes* **2004**, 1661(2), 204-211.
- ⁴⁵ Biagi, G.; Giorgi, I.; Livi, O.; Nardi, A.; Calderone, V.; Martelli, A.; Martinotti, E.; Salerni, O. L.: Synthesis and biological activity of novel substituted benzanilides as potassium channel activators. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39(6), 491-498.
- ⁴⁶ Brown, M. E.; Fitzner, J. N.; Stevens, T.; Chin, W.; Wright, C. D.; Boyce, J. P.: Salicylanilides: Selective inhibitors of interleukin-12p40 production. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16(18), 8760-8764.
- ⁴⁷ Boyce, J. P.; Brown, M. E.; Chin, W.; Fitzner, J. N.; Paxton, R. J.; Shen, M.; Stevens, T.; Wolfson, M. F.; Wright, C. D.: Identification of 14-3-3 ζ by Chemical Affinity with Salicylanilide Inhibitors of Interleukin-12p40 Production. *Bioconj. Chem.* **2008**, 19(9), 1775-1784.
- ⁴⁸ Ruschig, H.; König, J.; Dovel, D.; Loewe, H.: 2,6-Dihydroxybenzoessäurederivate als Anthelminthika. *Arzneim. Forsch.* **1973**, 23(12), 1745-1758.
- ⁴⁹ Boehringer Ingelheim G.m.b.H. N-Substituted 2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones. Hasspacher K. (inventor). US 3355453, 1967-11-28, 6 p.; Chem. Abstr. 69: 19169.
- ⁵⁰ Nippon Soda Co (JP). 2,3-Dihydro-4*H*-1,3-benzoxazines. Yasuda Y., Kosaka S., Myazaki Y., Yakushiji M. (inventors). JP 51004183. **1976**-01-14.; Chem. Abstr. 85: 21389.

-
- ⁵¹ Weuffen, W.; Wagner, G.; Winter, D.; Hellmuth, L.: 2-Hydroxythiobenzamide and 2-hydroxythiobenzalinides. II. Bacteriostatic properties of the compounds. *Pharmazie* **1966**, 21(8), 477-82.
- ⁵² Waisser, K.; Kubicová, L.: Biological effects of substances similar to salicylanilides. 3-Aryl-2*H*,4*H*-benz(e)(1,3)oxazine-2,4-diones and thiosalicylanilides. *Česk. Slov. Farm.* **1993**, 42(5), 218-22.
- ⁵³ Waisser, K.; Kubicova, L.; Gregor, J.; Budova, J.; Andrlíková, A.; Dršata, J.; Odlerová, Z.: Relationships between chemical structure and antimycobacterial activity against atypical strains. XIII. Thiosalicylanilides. *Česk. Slov. Farm* **1998**, 47(2), 84-86.
- ⁵⁴ Waisser, K.; Odlerová, Ž.: Differences in the antituberculostatic activities of drugs between *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **1995**, 18, 35-39.
- ⁵⁵ Kubicová, L.; Sedlák, M.; Chobot, V.; Macháček, M.: Process for preparing thiosalicylamides, in particular thiosalicylanilides. **2007**, CZ pat. 298498, 2007-10-17.
- ⁵⁶ Kubicová, L.; Sedlák, M.; Šustr, M.; Pravda, M.; Chobot, V.; Skála, P.; Buchta, V.; Macháček, M.; Waisser, K.: Preparation of antimycotic and antimycobacterial thiosalicylanilides. **2007**, CZ pat. 297581, 2007-01-10.
- ⁵⁷ Matysiak, J.; Niewiadomy, A.; Macik-Niewiadomy, G.; Kornilłowicz, T.: Dependence of fungistatic activity of 2,4-dihydroxythiobenzanilides on the structure and lipophilic nature of the compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35(4), 393-404.
- ⁵⁸ Matysiak, J.; Niewiadomy, A.; Macik-Niewiadomy, G.: In vitro inhibition properties of a new group of thiobenzanilides in relation to yeasts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 10(2), 119-123.
- ⁵⁹ Niewiadomy, A.; Matysiak, J.; Macik-Niewiadomy, G.: In vitro evaluation of 2,4-dihydroxythiobenzanilides against various moulds. *Eur. J. Pharm. Sci* **2001**, 13(3), 243-248.

-
- ⁶⁰ Niewiadomy, A.; Matysiak, J.; Zabinska, A.; Rozylo, J. K.; Senczyna, B.; Jozwiak, K.: Reversed-phase HPLC in quantitative structure-activity relationship studies of new fungicides. *J. Chromatog. A* **1998**, 828(1, 2), 431-438.
- ⁶¹ Niewiadomy, A.; Matysiak, J.; Macik-Niewiadomy, G.: The relationship between fungistatic activity of thiobenzanilides and their lipophilicity expressed in term of TLC parameters. *Pestycydy* **1999**, 1-2, 21-28.
- ⁶² Niewiadomy, A.; Matysiak, J.; Kostecka, M.; Macik-Niewiadomy, G.: Biological activity of a new group of thiobenzanilides. *Pestycydy* **1998**, 2-3, 11-15.
- ⁶³ Rozylo, J. K.; Zabinska, A.; Matysiak, J.; Niewiadomy, A.: Reversed-phase thin-layer chromatography with different stationary phases in studies of quantitative structure-biological activity relationship of new antimycotic compounds. *J. AOAC Internat.* **1999**, 82(1), 31-37.
- ⁶⁴ Rozylo, J. K.; Zabinska, A.; Matysiak, J.; Niewiadomy, A.: Reversed - phase HPTLC and structure - activity relationship for fungicidal substances. *Chem. Envir. Res.* **1998**, 7, 65-75.
- ⁶⁵ Jozwiak, K.; Szumilo, H.; Senczyna, B.; Niewiadomy, A.: Use of reversed-phase high-performance liquid chromatography in QSAR analysis of 2,4-dihydroxythiobenzanilide analogs. *SAR QSAR Envir. Res.* **1999**, 10(6), 509-532.
- ⁶⁶ Matysiak, J.; Krajewska-Kulak, E.; Karczewski, J.; Niewiadomy, A.: *N*-heterocyclic derivatives of 2,4-dihydroxybenzcarbothioamide as antimycotic agents. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49(11), 5251-7.
- ⁶⁷ Legocki, J.; Matysiak, J.; Niewiadomy, A.; Kostecka, M.: Synthesis and Fungistatic Activity of New Groups of 2,4-Dihydroxythiobenzoyl. Derivatives against Phytopathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem* **2003**, 51(2), 362-368.
- ⁶⁸ Niewiadomy, A.; Matysiak, J.; Macik-Niewiadomy, G.: The antibacterial activity of some 2,4-dihydroxythiobenzanilides substituted in the *N*-aryl ring. *Pestycydy* **2000**, 3-4, 43-51.

- ⁶⁹ Modzelewska-Banachiewicz, B.; Matysiak, J.; Niewiadomy, A.: Synthesis and mycological activity of the compounds obtained in the reaction of *N*3-substituted amidrazones with sulfinyl-bis-2,4-dihydroxybenzenethiopyl. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*(1), 75-80.
- ⁷⁰ Kowalska-Pylka, H.; Majer-Dziedzic, B.; Niewiadomy, A.; Matysiak, J.: Evaluation of the toxicity of substituted benzthioanilides by using in vitro tests. *ATLA* **2001**, *29*(5), 547-56.
- ⁷¹ Kleinrok, Z.; Niewiadomy, A.; Matysiak, J.: Evaluation of toxic activity of 2,4-dihydroxythiobenzanilides. *Pharmazie* **2002**, *57*(3), 198-200.
- ⁷² Nguyen, T. T. L.; Truong, T. P. T.: Synthesis and antibacterial and antifungal bioactivity of some amide derivatives of substituted benzoic acids. *Tap Chi Hoa Hoc* **2008**, *46*(6), 692-696.
- ⁷³ Vattipalli, R.; Shirodkar, P. Y.; Somani, R. R.; Kadam, V. J.: Synthesis and β -adrenergic blocking activity of naphthyloxypropylamines. *Ind. J. Chem., Sect. B* **2008**, *47B*(10), 1587-1590.
- ⁷⁴ Li, H.; Wang, C.; Sanchez, T.; Tan, Y.; Jiang, Ch.; Neamati, N.; Zhao, G.: Amide-containing diketoacids as HIV-1 integrase inhibitors: Synthesis, structure-activity relationship analysis, and biological activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*(7), 2913-2919.
- ⁷⁵ Liu, Y.; Donner, P. L.; Pratt, J. K.; Jiang, Wen W.; Ng, T.; Gracias, Vijaya; B., Steve; W., P. E.; Traphagen, L.; Warrior, U.; Maring, C.; Kati, W. M.; Djuric, S. W.; Molla, A.: Identification of halosalicylamide derivatives as a novel class of allosteric inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*(11), 3173-3177.
- ⁷⁶ Waisser, K.; Hladuvkova, J.; Kunes, J.; Kubicova, L.; Klimesova, V.; Karajannis, P.; Kaustova, J.: Synthesis and antimycobacterial activity of salicylanilides substituted in position 5. *Chem. Pap.* **2001**, *55*(2), 121-129.
- ⁷⁷ Waisser, K.; Matyk, J.; Divisova, H.; Husakova, P.; Kunes, J.; Klimesova, V.; Kaustova, J.; Mollmann, U.; Dahse, Hans-M.; Miko, M.: The oriented development of

antituberculotics: salicylanilides. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2006**, 339(11), 616-620.

⁷⁸ Hassan, G. S.; Hegazy, G. H.; Safwat, H. M.: Synthesis of furo-salicylanilides and their heterocyclic derivatives with anticipated molluscicidal activity. *Arch. Pharm.* (Weinheim, Germany) **2006**, 339(8), 448-455.

⁷⁹ Waisser, K.; Oswald, R.; Kunes, J.; Kaustova, J.: Antimycobacterial activity of 4-methoxysalicylanilides and 7-methoxy-3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2005**, 31-32, 33-40.

⁸⁰ Resck, I. S.; Dos Santos, M. L.; Romeiro, L. A. S.: New application of triphosgene in a convenient synthesis of 3-aryl-1,3-benzoxazine-2,4-diones from anacardic acids. *Heterocycles* **2005**, 65(2), 311-318.

⁸¹ Waisser, K.; Hladuvkova, J.; Kunes, J.; Kubicova, L.; Klimesova, V.; Karajannis, P.; Kaustova, J.: Synthesis and antimycobacterial activity of salicylanilides substituted in position 5. *Chem.l Pap.* **2001**, 55(2), 121-129.)

⁸² Waisser, K.; Cech, J.; Machacek, M.; Vanzura, J.; Celadnik, M.; Odlerova, Z.: Antituberculotics. XXXV. 4-Dimethylaminosalicylanilides. *Cesko-Slov. Farm.* **1986**, 35(6), 270-3.

⁸³ Dubey, S. K.; Singh, A. K.; Singh, H.; Sharma, S.; Iyer, R. N.; Katiyar, J. C.; Goel, P.; Sen, A. B.: Synthesis of substituted 1-hydroxy-2-naphthanilides as potential cestodicidal agents. *J. Med. Chem.* **1978**, 21(11), 1178-80.

⁸⁴ Grimmel, H. W.; Guenther, A.; Morgan, J. F.: Phosphazo compounds and their use in preparing amides. *J. Amer. Chem. Soc.* **1946**, 68(4), 539-542.

⁸⁵ Lemaire, H.; Schramm, C. H.; Cahn, A.: Synthesis and germicidal activity of halogenated salicylanilides and related compounds. *J. Pharm. Sci.* **1961**, 50, 831-837.

⁸⁶ Agrawal, V. K.; Sharma S.: Salicylanilides in the treatment of helminth diseases. *Pharmazie* **1984**, 39, 373-378.

-
- ⁸⁷ Kótai, A.; Szókán, G.: New salicylamide derivatives. II. Synthesis of the substituted hydrazides and further derivatives of 4-dimethylaminosalicylic acid. *Acta Pharm. Hung.* **1970**, *40*, 108-115.
- ⁸⁸ Spencer, J. R.; McGee, D.; Allen, D.; Katz, B. A.; Luong, C.; Sendzik, M.; Squires, N.; Mackman, R. L.: 4-Aminoarylguanidine and 4-aminobenzamidine derivatives as potent and selective urokinase-type plasminogen activator inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*(15), 2023-2026.
- ⁸⁹ Dahlgren, M. K.; Kauppi, A. M.; Olsson, Ing-M.; Linusson, A.; Elofsson, M. D.: Synthesis, and Multivariate Quantitative Structure-Activity Relationship of Salicylanilides-Potent Inhibitors of Type III Secretion in *Yersinia*. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*(24), 6177-6188.
- ⁹⁰ Vinsova, J.; Imramovsky, A.; Buchta V.; Ceckova, M.; Dolezal, M.; Staud, F.; Jampilek, J.; Kaustova, J.: Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings. *Molecules* **2007**, *12*,1.
- ⁹¹ Petyunin, P. A.; Berdinskii, I. S.; Shklyayev, V. S.: Reaction of N,N-bis(halomagnesium)arylamines with esters and acyl halides. *Zh. Obshch. Khim.* **1954**, *24*, 181-182.
- ⁹² Ioffe, I. S.; Zal'manovich, M. Z.: N-Substituted amides of salicylic acid and its derivatives. I. Arylamides of 3,5-dichlorosalicylic acid and 5-nitrosalicylic acid. *Zh. Obshch. Khim.* **1959**, *29*, 2682-2685.
- ⁹³ Boehme, H.; Nehne, J.: Substitution reactions of 6-amino-4-methylsalicylates. Part 3. Anilides, aminoethyl ethers and acetylation products of 6-amino-4-methylsalicylates. *Arch. Pharm. (Weinheim, Germany)* **1980**, *313*(8), 667-74.
- ⁹⁴ Ronald, R.: Boron Triiodide. e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, No pp. given; **2001**.
- ⁹⁵ Islam, A. M.; Hannout, I. B.; Hassan, E. A.; Ihsan, A. E.: Synthesis of some substituted salicylanilides of expected biological activity. *J. Prak. Chem. (Leipzig)* **1972**, *314*(5-6), 727-34.

- ⁹⁶ Black, M.; Cadogan, J. I. G.; McNab, H.: Pyrolysis of O-allyl salicylic amides and esters, and related compounds: formation of isoindolones and phthalides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 2, 155-9.
- ⁹⁷ Waisser, K.; Dražková, K.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Kaustová, J.: Antimycobacterial N-pyridinylsalicylamides, isosters of salicylamides. *Farmaco* **2004**, 59, 615-625.
- ⁹⁸ Veverková, E.; Mečiarová, M.; Toma, Š.; Balko, J.: Synthesis of substituted salicylanilides under microwave irradiation. *Monatsh. Chem.* **2003**, 134(9), 1215-19.
- ⁹⁹ Polanski, J.; Niedbala, H.; Musiol, R.; Podeszwa, B.; Tabak, D.; Palka, A.; Mencil, A.; Mouscadet, J.-F.; Le Bret, M.: Fragment based approach for the investigation of HIV-1 integrase inhibition. *Lett. Drug Design Disc.* **2007**, 4(2), 99-105.
- ¹⁰⁰ Desai, R. D.: Some new observations on the Friedel-Crafts reaction. *J. Indian Chem. Soc.* **1968**, 45(3), 193-199.
- ¹⁰¹ Piccolo, O.; Filippini, L.; Tinucci, L.; Valoti, E.; Citterio, A.: Boron trichloride-catalyzed ortho carbonylation of phenols: synthesis of 2-hydroxyarenecarboxamides and ketones. *Tetrahedron* **1986**, 42(3), 885-91.
- ¹⁰² Olesen, P. H.; Hansen, H. C.; Christiansen, L. B.; Nielsen, F. E.; Petersen, A. K.: Preparation of N-haloalkylsulfonylphenyl benzamides for treatment of obesity and diabetes. *PCT Int. Appl.*, 2006120178, 16 Nov **2006**.
- ¹⁰³ Zhang, L.; Zhang, J. Y.: Microwave-assisted synthesis of salicylamide via BCl₃ mediated coupling. *J. Bomb. Chem.* **2005**, 7(4), 622-626.
- ¹⁰⁴ Balduzzi, G.; Bigi, F.; Casiraghi, G.; Casnati, G.; Sartori, G.: Unusual Friedel-Crafts reactions. 5. Synthesis of salicylanilides via ortho-aminocarbonylation of phenols with phenyl isocyanate. *Synthesis* **1982**, 10, 879-881.
- ¹⁰⁵ Ikawa, T.; Barder, T. E.; Biscoe, M. R.; Buchwald, S. L.: Pd-Catalyzed Amidations of Aryl Chlorides Using Monodentate Biaryl Phosphine Ligands: A Kinetic,

Computational, and Synthetic Investigation. *J. Amer. Chem. Soc.* **2007**, 129(43), 13001–13007.

¹⁰⁶ Blade-Font, A.; Aguila, S.; De Mas, T.; Torres, J. M.: A convenient one-pot preparation of secondary and tertiary thioamides. *J. Chem. Res. Synopse* **1981**, 2, 58-9.

¹⁰⁷ Polshettiwar, V.: Phosphorus pentasulfide (P₄S₁₀). *Synlett* **2004**, 12, 2245-2246.

¹⁰⁸ Curphey, T. J.: Thionation with the reagent combination of phosphorus pentasulfide and hexamethyldisiloxane. *J. Org. Chem.* **2002**, 67(18), 6461-6473

¹⁰⁹ Turan, O.; Erdal, E.; Olcay, M.: Use of Lawesson's reagent in organic syntheses. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 5210-5278.

¹¹⁰ Dubsky, J. V.; Polster, M.: Comparison of the reactions of salicylamide and salicylthioamide. *Chem. Listy Vedu Prumysl* **1946**, 40, 209-10.

¹¹¹ Scheibye, S.; Pedersen, B. S.; Lawesson, S. O.: Studies on organophosphorus compounds. XXIII. Synthesis of salicylthioamides and 4*H*-1,3,2-benzoxazaphosphorine derivatives from the dimer of *p*-methoxyphenylthionophosphine sulfide and salicylamides. *Bull. Soc Chim. Belg.* **1978**, 87(4), 299-306.

¹¹² Cava, M. P.; Levinson, M. I.: Thionation reactions of Lawesson's reagents. *Tetrahedron* **1985**, 41(22), 5061-5087.

¹¹³ Yde, B.; Yousif, N. M.; Pedersen, U.; Thomsen, I.; Lawesson, S. O.: Studies on organophosphorus compounds. XLVII. Preparation of thiated synthons of amides, lactams and imides by use of some new phosphorus- and sulfur-containing reagents. *Tetrahedron* **1984**, 40(11), 2047-52.

¹¹⁴ Waisser, K.; Gregor, J.; Kubicova, L.; Klimesova, V.; Kunes, J.; Machacek, M.; Kaustova, J.: New groups of antimycobacterial agents: 6-chloro-3-phenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 6-chloro-3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35(7-8), 733-741.

¹¹⁵ Waisser, K.; Matyk, J.; Kunes, J.; Dolezal, R.; Kaustova, J.; Dahse, Hans-M.: Highly active potential antituberculotics: 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-

2(3H)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dihiones substituted in ring-B by halogen. *Arch. Pharm.* (Weinheim, Germany) **2008**, *341*(12), 800-803.

¹¹⁶ Wagner, G.; Singer, D, Weuffen, W.: Untersuchungen über 2-hydroxythiobenzamide und 2-hydroxythiobenzanilide. *Pharmazie* **1966**, *21*, 161-6.

¹¹⁷ Truong, Phuong; Vu, Thi Phuong Van; Le, Thi Thanh Thao.: Study on thionylation to synthesize thiosalicylanilide derivatives with antifungal and antibacterial activities. *Tap Chi Duoc Hoc* **2005**, *45*(10), 8-12.

¹¹⁸ Dolezal, R.; Waisser, K.; Petrlikova, E.; Kunes, J.; Kubicova, L.; Machacek, M.; Kaustova, J.; Dahse, Hans M.: N-benzylsalicylthioamides: highly active potential antituberculotics. *Arch. Pharm.* (Weinheim, Germany) **2009**, *342*(2), 113-119.

¹¹⁹ Kurz, J.; Koelling, H.; Federmann, M.: Thionosalicylanilides. Patent (**1973**), DE 1793577 19731129

¹²⁰ Kurz, J.; Koelling, H.; Federmann, M.: Thionosalicylanilides. Patent (**1973**), DE 1793575 19731129

¹²¹ Kurz, J.; Koelling, H.; Federmann, M.: Thionosalicylanilides. Patent (**1973**), DE 11793578 19731129

¹²² Jagodzinski, T.: A simple metod for the syntheses of thiobenzamides by Friedel-Crafts reaction. *Synthesis* **1988**, *9*, 717-20.

¹²³ Sosnicki, J.; Jagodzinski, T.; Królikowska, M.: Thioamide derivatives of Cannabinoids, A study of the influence of the thioamide function on regiochemistry in the synthesis of thioamide Cannabinoids from 2,4-dihydroxybenzothioamides. *J. Het. Chem.* **1999**, *36*, 1033-41.

¹²⁴ Niewiadomy, A.; Matysiak, J.; Fekner, Z.; Cieczko, R.: Synthesis, antifungal activity and SAR of N-substituted and N,N-disubstituted 2,4-dihydroxythiobenzamides. *J. Pest. Sci.* (Tokyo, Japan) **2006**, *31*(1), 14-22.

- ¹²⁵ Legocki, J.; Matysiak, J.; Niewiadomy, A.; Kostecka, Ma-I: Synthesis and Fungistatic Activity of New Groups of 2,4-Dihydroxythiobenzoyl Derivatives against Phytopathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem* **2003**, 51(2), 362-368.
- ¹²⁶ Matysiak, J.; Niewiadomy, A.: Application of in the synthesis of N-substituted 2-amino-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles. *Synt. Commun.* **2006**, 36(11), 1621-1630.
- ¹²⁷ Katritzky, A. R.; Singh, S. K.; Akhmedova, R.; Cai, Ch.; Bobrov, S.: Efficient synthesis of 1,3-benzodioxin-4-ones and benzoxazine-2,4-diones. *ARKIVOC* (Gainesville, FL, United States) **2007**, 6, 6-13.
- ¹²⁸ Waisser, K.; Matyk, J.; Divišová, H.; Husáková, P.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Palát, K.; Kaustová, J.: The oriented development of antituberculotics (part II): halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4-(3H)-diones. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, 340, 264
- ¹²⁹ Truong, P.; Nguyen, B. T.; Le, T. T.h T.: Synthesis and antibacterial activity of some 1,3-benzoxazin-2,4-dione derivatives. *Tap Chi Duoc Hoc* **2006**, 46(1), 14-7.
- ¹³⁰ Hassan, G. S.; Hegazy, G. H.; Safwat, H. M.: Synthesis of furo-salicylanilides and their heterocyclic derivatives with anticipated molluscicidal activity. *Arch. Pharm.* (Weinheim, Germany) **2006**, 339(8), 448-455.
- ¹³¹ Waisser, K.; Oswald, R.; Kunes, J.; Kaustova, J.: Antimycobacterial activity of 4-methoxysalicylanilides and 7-methoxy-3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2005**, 31-32, 33-40.
- ¹³² Waisser, K.; Bures, O.; Holy, P.; Kunes, J.; Oswald, R.; Jiraskova, L.; Pour, M.; Klimesova, V.; Palat, K., Jr.; Kaustova, J.; Danse, H.-M.; Moellmann, U.: Antimycobacterial 3-aryl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. *Pharmazie* **2003**, 58(2), 83-94.
- ¹³³ Waisser, K.; Hladuvkova, J.; Holy, P.; Machacek, M.; Karajannis, P.; Kubicova, L.; Klimesova, V.; Kunes, J.; Kaustova, J. 2H-1,3-Benzoxazine-2,4(3H)-diones substituted in position 6 as antimycobacterial agents. *Chem. Pap.* **2001**, 55(5), 323-334.

- ¹³⁴ Agarwal, A.; Agarwal, S. K.: Antiparasitic agents: Part XVII. Synthesis of 2-methylmercapto-7-*H*/phenyl-1*H*,6*H*-pyrido[3,4-*b*]imidazo[4,5-*e*]indoles, 6-/8-(4-oxo-2-thioxoquinazolin-3-yl)-1-*H*/phenyl-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indoles and 6-/8-(2,4-dioxo-1,3-benzoxazin-3-yl)-1-phenyl-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indoles as anthelmintic agents. *Indian J. Chem.* **1995**, 34*B*(4), 323-6.
- ¹³⁵ Brown, F. J.; Bernstein, Peter R.; Cronk, L. A.; Dosset, D. L.; Hebbel, K. C.; Maduskuie, T. P., Jr.; Shapiro, H. S.; Vacek, E. P.; Yee, Y. K.: Hydroxyacetophenone-derived antagonists of the peptidoleucotrienes. *J. Med. Chem.* **1989**, 32(4), 807-26.
- ¹³⁶ Waisser, K.; Kubicova, L.; Klimesova, V.; Odlerova, Z.: Antituberculotics. LXV. New groups of potential antituberculotics: 3-aryl-2*H*,4*H*-benz[*e*][1,3]oxazine-2,4-diones. Comparison of the Topliss approach with regression analysis. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1993**, 58(12), 2977-82.
- ¹³⁷ Larksarp, Ch.; Alper, H.: Palladium-Catalyzed Cyclocarbonylation of *o*-Iodophenols and 2-Hydroxy-3-iodopyridine with Heterocumulenes: Regioselective Synthesis of Benzo[*e*]-1,3-oxazin-4-one and Pyrido[3,2-*e*]-1,3-oxazin-4-one Derivatives. *J. Org. Chem.* **1999**, 64(25), 9194-9200.
- ¹³⁸ Shibuya, I.; Goto, M.; Shimizu, M.; Yanagisawa, M.; Gama, Y.: Silver(I) ion-mediated desulfurization-cyclization of isothiocyanates with several hydroxy acids and *N*-substituted amino acids. *Heterocycles* **1999**, 51(11), 2667-2673.
- ¹³⁹ Butt, A.; Khan, A. M.; Perveen, R.; Kemal, R.: Synthesis of heterobicyclic compounds. III. Formation of 2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* **1972**, 14(3), 192-193.; Chem. Abstr. 76: 46151.
- ¹⁴⁰ Boontheung, P.; Perlmutter, P.: A highly-efficient synthesis of benzoxazine-2,4-diones. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39(17), 2629-2630.
- ¹⁴¹ Heinisch, L.; Gebhardt, P.; Heidersbach, R.; Reissbrodt, R.; Mollmann, U.: New synthetic catecholate-type siderophores with triamine backbone. *BioMetals* **2002**, 15(2), 133-144.

-
- ¹⁴² Heinisch, L.; Wittmann, S.; Stoiber, T.; Berg, A.; Ankel-Fuchs, D.; Moellmann, U.: Highly Antibacterial Active Aminoacyl Penicillin Conjugates with Acylated Bis-Catecholate Siderophores Based on Secondary Diamino Acids and Related Compounds. *J. Med. Chem.* **2002**, 45(14), 3032-3040.
- ¹⁴³ Abdel-Fattah, A. A.; Nasar, S. A.; El-Shenawy, A. I.: 1-Azido-4-phenyl-1,4-butanedione as a convenient precursor for the synthesis of various nitrogen heterocycles. *Egypt. J. Chem.* **2003**, 46(1), 153-162.
- ¹⁴⁴ Waisser, K.; Holy, P.; Bures, O.; Kunes, J.; Kaustova, J.: New groups of potential antituberculotics: 3-(4-ethoxythiocarbonylphenyl)-2*H*-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones and thione analogs. *Ces. Slov. Farm.* **2003**, 52(1), 42-48.
- ¹⁴⁵ Wagner, G.; Leistner, S.; Winkler, K.: Preparation of thioxo sologous derivatives of 2,4-dioxo-3,4-dihydro-2*H*-naphth[2,3-*e*]-1,3-oxazines, of thioamides of 3-hydroxy-2-naphthoic acid, and of 3-hydroxy-2-naphthoyl ureas, semicarbazides, and thiosemicarbazides. *Pharmazie* **1974**, 29(10-11), 681-4.
- ¹⁴⁶ Chimmanamada, D. U.; Ying, W.; Przewloka, T.; Zhang, S.; Foley, K.; Du, Z.; Zhou, D.; Qin, S.: Preparation of triazole compounds that modulate HSP90 activity. *PCT Int. Appl.* **2007**139968, 06 Dec 2007.
- ¹⁴⁷ Jagodzinski, T.: The Friedel-Crafts reaction of phenols with carbethoxy isothiocyanate. *Org. Prep. Proc. Internat.* **1990**, 22(6), 755-60.
- ¹⁴⁸ Tamura, Y.; Kawasaki, T.; Tanio, M.; Kita, Y.: Isothiocyanation of carboxylic acids with the combined reagent, $\text{Ph}_3\text{P}(\text{SCN})_2$: a new one-step synthesis of 2-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-4-ones and related compounds. *Chem. Ind. (London, United Kingdom)* **1978**, 20, 806-7.
- ¹⁴⁹ Pritchard, K. M.; Al-Rawi, J.; Bradley, Ch.: Synthesis, identification and antiplatelet evaluation of 2-morpholino substituted benzoxazines. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42(9), 1200-1210.
- ¹⁵⁰ Pritchard, K. M.; Al-Rawi, J.: Reaction of $\text{Ph}_3\text{P}(\text{SCN})_2$ with further ortho-hydroxy carboxylic acid systems, including substituted β -keto acids: Synthesis of novel 2-thioxo-

1,3-oxazines and their subsequent transformation with amines. *Synt. Commun.* **2008**, 38(23), 4076-4096.

¹⁵¹ Iijima, T.; Yamaguchi, T.: K₂CO₃-catalyzed direct synthesis of salicylic acid from phenol and supercritical CO₂. *Appl. Catal. A* **2008**, 345(1), 12-7.

¹⁵² Muradov, S.; Khamidov, B. N.; Kadyrov, Ch. Sh.: p-Alkylphenol carboxylation with carbon dioxide. *O'zbekiston Kimyo Jurnal* **2004**, 5, 24-5.

¹⁵³ Mendel, D. et al.: Anthranilamide inhibitors of factor Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17(17), 4832-6.

¹⁵⁴ Kawai, T.; Kuwabara, T.; Yoshino, K.: Photocatalytic fixation of carbon dioxide with conducting polymer. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1992**, 88(14), 2041-6.

¹⁵⁵ Yang, J. Y.; Nocera, D. G.: Manganese amido-imine bisphenol Hangman complexes. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49(32), 4796-8.

¹⁵⁶ Scheurer, A.; Mosset, P.; Bauer, W.; Saalfrank, R. W.: A practical route to regiospecifically substituted (R)- and (S)-oxazolyphenols. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 16, 3067-3074.

¹⁵⁷ Fedorova, R. I.; Kustanovich, Z. D.; Isagulyants, V. I.: Synthesis of dialkyl-substituted methyl ester of salicylic acid. *Zh. Prikl. Khim.* **1967**, 40(3), 631-5.

¹⁵⁸ Jimenez, C. A.; Belmar, J. B.: Convenient and efficient method for the obtainment of ketones from highly hindered aromatic N,N-dimethyl-amides. *Synt. Commun.* **2007**, 37(14), 2391-2397.

¹⁵⁹ Belmar, J.; Bartulin, J.; Aillón, M.: Synthesis of some 2-hydroxy-3,5-di-tert-butylbenzamides. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **1991**, 36, 3-10.

¹⁶⁰ Juany, Ch.: Preparation of 3,5-di-tert-butylsalicylic acid by carboxylation of 3,5-di-tert-butylphenol. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 1319584, 31 Oct **2001**.

- ¹⁶¹ Ueno, R.; Kitayama, M.; Otsuka, R.; Shirai, T.: Process for production of hydroxybenzoic acids. *PCT Int. Appl.*, 2004078693, 16 Sep **2004**.
- ¹⁶² Ueno, R.; Kitayama, M.; Wakamori, H.; Yonetani, N.; Hisano, T.: Process for production of hydroxybenzoic acids. *PCT Int. Appl.*, 2004031113, 15 Apr **2004**.
- ¹⁶³ Furuya, M.; Nagatomo, A.; Wada, M.: Preparation of 3,5-dialkylsalicylic acids. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 10087562, 07 Apr **1998**, Heisei.
- ¹⁶⁴ Furuya, M.; Nagatomo, A.; Wada, M.: Preparation of hydroxybenzoic acids. *Eur. Pat. Appl.*, 834494, 08 Apr **1998**.
- ¹⁶⁵ Chidambaram, M. V.; Sorenson, J. R. J.: On the Kolbe-Schmitt synthesis of pharmacologically useful salicylates: carboxylation of 2,4-di-tert-butylphenol and identification and reduction of the formation of 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetra-tert-butylbiphenyl in the synthesis of 3,5-di-tert-butylsalicylic acid. *J. Pharm. Sci.* **1991**, 80(8), 810-11.
- ¹⁶⁶ Hanusek, J.; Rosa, J.; Drabina, P.; Sedlák, M.: Cyclization of 2-benzoylamino-N-methyl-thiobenzamides to 3-methyl-2-phenylquinazoline-4-thiones. *J. Het. Chem.* **2006**, 43(5), 1281-5.
- ¹⁶⁷ Kubicová, L.; Šustr, M.; Král'ova, K.; Chobot, V.; Vytlačilová, J.; Jahodář, L.; Vuorela, P.; Macháček, M.; Kaustová, J.: Synthesis and biological evaluation of quinazoline-4-thiones. *Molecules* **2003**, 8(11), 756-9.
- ¹⁶⁸ Wagner, G.; Gentzsch, H.: Methyl derivatives of 4-hydroxy- and 4-mercapto-1,2,3-benzotriazine. *Pharmazie* **1968**, 23(11), 629-38.
- ¹⁶⁹ Nomoto, Y.; Obase, H.; Takai, Haruki; Teranishi, M.; Nakamura, J.; Kubo, Katuji.: Studies on cardiotonic agents. II. Synthesis of novel phthalazine and 1,2,3-benzotriazine derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38(8), 2179-83.
- ¹⁷⁰ Barker, A. J.; Paterson, T. M.; Smalley, R. K.; Suschitzky, H.: 1,2,3-Benzotriazin-4(3H)-ones and related systems. Part 5. Thermolysis of 3-aryl- and 3-alkenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 9, 2203-8.

- ¹⁷¹ Kubicová, L.; Dostál, H.; Kuneš, J.; Král'ova, K.; Buchta, V.; Kaustová, J.; Waisser, K.: Synthesis and biological activity of 2-amino-N-phenylbenzamides and 3-phenyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ones. Proceedings of ECSOC-3, [and] Proceedings of ECSOC-4, Sept. 1-30, **1999** and **2000, 1999-2000**, 1358-1369; **2000**
- ¹⁷² Jenkins, V. K.: Preparation of urea derivatives for treating hematologic diseases. *Eur. Pat. Appl.* **1989**, EP 324521 A2 19890719.
- ¹⁷³ Byatnal, V. N.; Desai, R. D.: The Friedel-Crafts reaction. X. The action of acetic anhydride on the arylamides of β -resorcylic acid. *J. Indian Chem. Soc.* **1952**, 29, 555-9.
- ¹⁷⁴ Akutsu, M.; Tominaga, N.; Oya, K.; Toita, A.; Shigeno, K.: Heat-sensitive recording material. *Eur. Pat. Appl.* **1995**, EP 687571 A2 19951220.
- ¹⁷⁵ Grecian, S.; Wroblewski, A. D.; Aube, J.: Regioselective Single and Double Conjugate Additions to Substituted Cyclohexa-2,5-dienone Monoacetals. *Org. Lett.* **2005**, 7(15), 3167-3170.
- ¹⁷⁶ Schraufstaetter, E.; Meiser, W.; Goennert, R.: A new molluscicide. I. Relations between structure and activity. *Ztsch Naturforsch.* **1961**, 16b, 95-108.
- ¹⁷⁷ Heberer, H.; Reinholz, D.; Lukowczyk, B.; Erfurt, G.: Phenol derivatives. Ger. (East) **1973**, DD 100457 19730920.
- ¹⁷⁸ Kumar, A.; Singh, A.; Kumar, R.; Prasad, A. K.; Parmar, V. S.: Combinatorial approach towards synthesis of 2',3'-dideoxynucleosides and enzyme-catalyzed selective hydrolysis of diethyl acetamidomalonate and amides of polyacetoxy aromatic carboxylic acid. *Indian J. Chem., Sect. A* **1997**, 36A(6), 507-512.
- ¹⁷⁹ Eastman, Kodak Co. (US) Hydroxybenzamides for stabilization of normally oxidizable materials. Bell, A.; Lappin, G. R. (inventors).: US 2848335. **1958**-08-19.; Chem. Abstr. 53:8419.
- ¹⁸⁰ Farbwerke, H. A.-G.: (DE) 2,6-Dihydroxybenzoesaeure-anilide und ihre Verwendung als Pflanzenschutzmittel. Ruschig, H.; König, J.; Haertel, K.; (inventors). DE, Ger. Offen. 1945255 A. **1971**-03-18.; Chem. Abstr. 74: 141320.

-
- ¹⁸¹ Ruschig, H.; Koenig, J.; Duewel, D.: γ -Resorcylic acid anilides. Ger. **1975**, DE 1303920 19750626.
- ¹⁸² Desai, R. D.; Marballi, M. S.: Coumarins from arylamides of β -resorcylic acid. *J. Sci. Ind. Res.* **1952**, 11B, 292-294.
- ¹⁸³ Xin, Z.; Liu, G.; Pei, Z.; Szczepankiewicz, B. G.; Serby, M. D.; Zhao, H.: Preparation of arylisoxazolecarboxylates as protein-tyrosine phosphatase (PTP1B) inhibitors. U.S. Pat. Appl. Publ. **2004**, US 2004214870 A1 20041028.
- ¹⁸⁴ Xin, Z.; Liu, G.; Pei, Z.; Szczepankiewicz, B. G.; Serby, M. D.; Zhao, H.: Preparation of arylazole derivatives as protein-tyrosine phosphatase inhibitors. U.S. Pat. Appl. Publ. **2004**, US 2004167188 A1 20040826.
- ¹⁸⁵ Nomoto, T.; Kawakami, K.; Akagawa, A.; Matsuyama, K.; Torigoe, K.: Preparation of hydroxybenzamide derivatives as prevention and treatment agents for bone diseases. Jpn. Kokai Tokkyo Koho **1996**, JP 08143525 A 19960604.
- ¹⁸⁶ Matysiak, J.; Niewiadomy, A.; Macik-Niewiadomy, G.: In vitro inhibition properties of a new group of thiobenzanilides in relation to yeasts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 10(2), 119-123.
- ¹⁸⁷ Ginwala, K. K.; Trivedi, J. P.: Friedel-Craft reaction of isothiocyanates. I. Aryl isothiocyanates. *J. Indian Chem. Soc.* **1963**, 40(10), 897-8.
- ¹⁸⁸ Nippon Soda Co (JP). 2,3-Dihydro-4H-1,3-benzoxazines. Yasuda Y., Kosaka S., Myazaki Y., Yakushiji M. (inventors). JP 51004183. **1976**-01-14.; Chem. Abstr. 85: 21389.
- ¹⁸⁹ Amin, G. Ch.; Shah, N. M.: Fries reaction. VII. Fries migration of the acetyl and benzoyl esters of methyl β -resorcyate and β -resorcylic acid. *J. Indian Chem. Soc.* **1952**, V29, P351-6.
- ¹⁹⁰ Bindra, R.; Singh, H.; Sharma, S.; Iyer, R. N.: Synthesis and antimicrobial activity of 4-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazine- and naphthoxazine-2-thiones and related compounds. *Indian. J. Pharm.* **1975**, 37(6), 133-6.

-
- ¹⁹¹ Scheurer, A.; Mosset, P.; Bauer, W.; Saalfrank, R. W.: A practical route to regiospecifically substituted (R)- and (S)-oxazolyphenols: *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 16, 3067-3074.
- ¹⁹² Matsui, S.; Mitani, M.; Fujita, T.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho **2000**, JP 2000086677 A 20000328.
- ¹⁹³ Drain, D. J.; Davy, B.; Horlington, M.; Howes, J. G. B.; Scruton, J. M.; Selway, R. A.: Effects of substituting tetrazole for carboxyl in two series of antiinflammatory phenoxyacetic acids. *J. Pharm. Pharmacol.* **1971**, 23(11), 857-64.
- ¹⁹⁴ Legrand, S.; Nordlander, G.; Nordenhem, H.; Borg-K., Anna-K.; Unelius, C.: Hydroxy-methoxybenzoic methyl ester: Synthesis and antifeedant activity on the pine weevil, *Hylobius abietis*. *Ztsch. Naturforsch., B* **2004**, 59(7), 829-835.
- ¹⁹⁵ Akagi, S.; Yasukawa, Y.; Kobayashi, K.; Konishi, H.: Synthesis and solid state structure of oxacalix[4]arenes bearing four nitro groups and four tert-butyl groups at their extra-annular positions. *Tetrahedron* **2009**, 65(48), 9983-9988.
- ¹⁹⁶ Kobayakawa, T.; Yasuda, H.; Imamura, H.: Pharmaceutical preparation containing 3,5-di-tert-butyl-2,6-dihydroxybenzoic acid, its salts or its lower alkyl esters. Ger. Offen. **1977**, DE 2700352 19770714.
- ¹⁹⁷ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: Approved Standard M27-A. NCCLS, Villanova, PA, **1997**.
- ¹⁹⁸ Skála, P.; Macháček, M.; Vejsová M.; Kubicová, L.; Kuneš, J.; Waisser, K.: Synthesis and antifungal evaluation of hydroxy-3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones and their thioanalogs. *J. Het. Chem.* **2009**, 46(5), 873-880.
- ¹⁹⁹ Šustr M.: *Příprava a biologická aktivita thiosalicylanilidů*. Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové **2005**.
- ²⁰⁰ Waisser, K.; Hladuvková, J.; Gregor, J.; Rada, T.; Kubicová, L.; Klimešová, V.; Kaustová, J. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1998**, 331, 3.

- ²⁰¹ Lesser, R.; Gad, G.: Acylation of aromatic hydroxycarboxylic acids. *Ber. Deutsch. Chem. Gesellsch. B* **1926**, 59B, 233-6.
- ²⁰² Baier, J. L.; Timmer, S. M.; Teesdale-Spittle, H. P., Harvey, E. J.: Total synthesis of Aigialomycin D using a Ramberg-Bäcklund/RCM strategy. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 2271-7.
- ²⁰³ Šustr, M.; Hrciarová, D.; Látalová, M.; Pravda, M.; Kubicová, L.: Biological activity of N-substituted thiobenzamides and related compounds. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2003**, 29-30, 39-54.
- ²⁰⁴ Walter, W.; Fleck, T.; Voss, J.; Erwin, M.: Structure of thioamides and their derivatives. XXXII. Synthesis, ir, and proton NMR-spectroscopic studies on 2-aminobenzamides and –thioamides. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 254-294.
- ²⁰⁵ Skála, P.; Macháček, M.; Kubicová, L.; Kaustová, J.; Buchta, V.; Waisser, K.: Synthesis of 3-Phenyl-1,2,3-benzotriazine-4(3H)-thiones, Their Antifungal and Antimycobacterial Activities. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2009**, 38, S 47-54.
- ²⁰⁶ Matyk, J.; Waisser, K.; Dražková, K.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Palát, K. Jr.; Kaustová, J.: Heterocyclic isosters of antimycobacterial salicylanilides. *Farmaco* 2005, 60(5), 399-408.
- ²⁰⁷ Oktábec, Z.: Diplomová práce. *Syntéza antimykobakteriálně aktivních anilidů a jejich sirných analogů*. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové **2008**.